

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年10 月13 日 (13.10.2005)

PCT

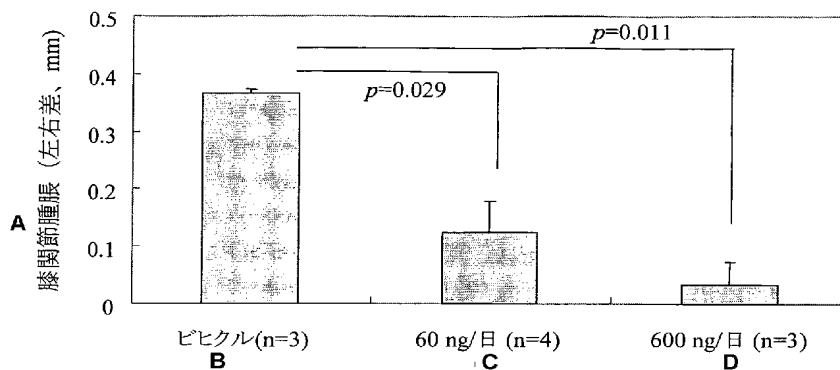
(10) 国際公開番号
WO 2005/094889 A1

- (51) 国際特許分類⁷: **A61K 45/00**, 38/00, 45/06, A61P 17/00, 17/06, 19/02, 19/06, 19/10, 29/00, 31/04, 31/06, 31/10, 31/12, 37/02, 43/00
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 中尾 一和 (NAKAO, Kazuwa) [JP/JP]; 〒6101101 京都府京都市西京区大枝北沓掛町4-1-2 Kyoto (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006831
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 北村 秀智 (KITAMURA, Hidetomo) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).
- (22) 国際出願日: 2005 年3 月31 日 (31.03.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-107924 2004 年3 月31 日 (31.03.2004) JP
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: REMEDY OR PREVENTIVE FOR ARTHRITIS

(54) 発明の名称: 関節炎症治療剤又は予防剤



A... KNEE JOINT SWELL (DIFFERENCE BETWEEN
LIGHT AND LEFT, mm)
B... VEHICLE (n=3)
C... 60 ng/DAY (n=4)
D... 600 ng/DAY (n=3)

(57) Abstract: It is intended to provide a novel remedy or a preventive for arthritis such as arthritis deformans. More specifically speaking, a remedy or a preventive for arthritis such as arthritis deformans or a joint cartilage cell growth promoter characterized by containing, as the active ingredient, a guanyl cyclase B (GC-B) activator; a method of inhibiting arthritis or a method of promoting the growth of joint cartilage cells by activating GC-B; or a method of screening a joint cartilage cell growth promoter or a remedy for arthritis by using GC-B activity as an indication.

[続葉有]

WO 2005/094889 A1



NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 本発明は、変形性関節症などの関節炎症に対する新しい治療剤または予防剤を提供する。具体的には、本発明は、グアニルシクラーゼB (GC-B) 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、変形性関節炎症などの関節炎症の治療剤、予防剤または関節軟骨細胞増殖促進剤、あるいは、GC-Bを活性化することによる関節炎症の抑制方法又は関節軟骨細胞の増殖促進方法、あるいは、GC-Bの活性を指標とした関節軟骨細胞増殖促進剤又は関節炎症治療剤のスクリーニング方法を提供する。

明 細 書

関節炎症治療剤又は予防剤

技術分野

本発明は、グアニルシクラーゼ B（以下「GC-B」とも称する）活性化物質による関節炎症、特に変形性関節症及びその類似関節炎症、の治療剤、予防剤又は関節軟骨増殖促進剤、あるいは該関節炎症の抑制方法、関節軟骨細胞の増殖促進方法に関する。本発明はさらに、GC-B の活性を指標とする、関節炎症治療剤又は関節軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法に関する。

発明の背景

関節炎症は、関節の炎症性疾患であり、症例数の最も多い疾患が慢性関節リウマチ及び変形性関節症（骨関節症）である。

慢性関節リウマチは、自己免疫疾患と考えられており、関節の疼痛、こわばり、腫脹の症状を伴うが、病状が進行すると、しばしば変形性関節症様の関節軟骨表面の変性に導き、ついには関節の骨や軟骨の重度の破壊が起こる。

変形性関節症は高齢者において多発する関節軟骨の変性疾患である。変形性関節症(OA)とは、関節の構成要素の退行変性により、軟骨の破壊と骨、軟骨の増殖性変化を来たす疾患であり、さらに上記変化により二次的（続発性）に関節炎（滑膜炎）を来たすものである。変形性関節症は荷重関節である膝関節、肘関節および股関節にて多く認められるが（Virchows Arch 1996;260:521-663）、肩関節・肘関節・手関節のような非荷重関節においても発生が認められる。さらに顎関節においても同様の病態を示す顎関節症が知られている（J Orofac Pain 1999;13(4):295-306）。

変形性関節症においては、軟骨はその機能本体である軟骨基質蛋白が減じるとともに、軟骨細胞数が減少していることが知られている（Arth Rheum 2002; 46(8): 1986-1996）。しかし、軟骨には血管が分布していないこと、軟骨細胞の数が少なく高度に分化していること、軟骨前駆細胞が乏しいこと、軟骨基質の代謝回転が

遅いことなどの理由から、軟骨の自己再生能力は低く変形性関節症における関節軟骨基質と軟骨細胞数の減少が自然治癒する可能性は非常に低い (Novartis Found. Symp. 2003;249:2-16)。また、変形性関節症においては、軟骨変性とともに関節炎症も同時に生じ、関節疼痛の原因となっている (J Rheumatol 2001;28(6):1330-1337)。

慢性関節リウマチ、変形性関節症などの関節炎の治療剤・予防剤としては、例えばプロテインチロシンキナーゼインヒビター(特表平 11-512708 号公報)、N-アシル化-2-グルコサミン誘導体(特表 2004-507490 公報)、キノリン・キナゾリン系誘導体(特開平 9-169646 号公報)、などが報告されている。また、現在広く用いられている標準的な変形性関節症の治療剤は、経口で投薬される消炎鎮痛剤や、関節内に注射されるヒアルロン酸や副腎皮質ステロイドなどで、いずれも関節疼痛の抑制剤であり、関節軟骨変性に対する抑制作用を有する薬剤が求められている (Decision Base 7, 2002)。

グアニルシクラーゼ (GC) は、GTP からセカンドメッセンジャーである cGMP の合成を触媒する酵素ファミリーに属する膜蛋白質であり、GC-A, GC-B, ..., GC-F が知られている。GC-B は主に血管内皮細胞に見出され、平滑筋の弛緩に関与すると考えられている。GC を活性化する物質としてナトリウム利尿ペプチド (NP) が知られている。NP 類は、ANP (心房性ナトリウムペプチド)、BNP (脳性ナトリウム利尿ペプチド) および CNP (C 型ナトリウム利尿ペプチド) の 3 種類からなり、2 種類のグアニルシクラーゼ共役受容体 (ANP および BNP に対する NPR-A、CNP に対する NPR-B) を介して、細胞内 cGMP 濃度を上昇させることにより、生物学的活性を示すと考えられている (Ann Rev Biochem 1991;60: 229-255)。

グアニルシクラーゼ共役受容体でない NPR-C は、シグナル伝達に関与しない NP 類のクリアランス受容体として理解されている (Science, 1987; 238:675-678)。しかし、マウス骨髄マクロファージをリポポリサッカライド (LPS) 刺激したときのシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) 誘導によるプロスタグランジン E_2 (PGE_2) 産生を亢進させる系において、ANP および CNP が NPR-C を介した細胞内 cAMP 量低下作用にもとづいて ANP および CNP が PGE_2 産生抑制作用を示すことが報告されており、NPR-C の NP 類のシグナル伝達への関与が示唆されている (Endocrinology 2002;

143(3):846-852)。この文献では、マウス骨髄マクロファージ(BMM)のLPS刺激によるPGE₂産生亢進に対して、ANPが最大約70%の抑制効果を示すのに対して、CNPは最大約20%の抑制効果であり、CNPの同作用が弱いことが記載されている。cAMPやcGMPなどのcyclic nucleotideを介したCOX-2の産生の制御は、細胞の種類や刺激の種類により促進/抑制と正反対の反応を取ることが知られているため、CNPによるBMM細胞でのLPS誘導のPGE₂産生抑制がその他の細胞や刺激に対して適用できるかは不明である。また、Endocrinology 2002; 143(3):846-852には、ANPはマウスにLPSを投与して血中トロンボキサンB₂(TXB₂)濃度が上昇する系において抑制効果を示すことが報告されており、同じ機序のcANFでは逆に亢進させるという相反する結果が得られている。またこの文献ではANPを関節炎や敗血症などの免疫関連疾患に適応することが記載されているものの、CNPの関節疾患への適応について何ら言及していない。従ってCNPの関節炎症に対する作用については、現在まで全く知られていない。

NP類は、体液の恒常性の制御や血圧の調節に重要な役割を果たすと報告されているが(J Clin Invest 1987;93:1911-1921、J Clin Invest 1994; 87: 1402-1412)、心臓血管系以外の様々な組織での発現とその生理活性も知られている(Endocrinol 1991;129:1104-1106、Ann Rev Biochem 1991;60: 553-575)。軟骨に関しては、BNP (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998;95:2337-2342)またはCNPの過剰発現トランスジェニックマウスにおける成長軟骨の伸長と軟骨無形成症の治療へのCNPの使用が報告されている(Nat Med 2004;10(1):80-86、特開2003-113116公報)。しかし、成長軟骨は石灰化を経て骨に置換されて最終的に消失する一時性軟骨であり、関節軟骨や気管軟骨のように、生涯にわたり存在する永久軟骨とは異なる生物学的性質を有することが知られている(Dev Biol 1989;136(2):500-507、J Cell Biol 2001;153(1):87-100)。さらに、永久軟骨である関節軟骨細胞に対するCNPの肥大化促進作用がin vitroで報告されているが(J Biol Chem 2003;278(21):18824-18832)、正常動物の関節軟骨に対するin vivoでの作用や変形性関節症における関節軟骨の変性破壊に対する作用や同疾患における関節炎症に対する作用については現在まで知られていない。

変形性関節症においては、関節軟骨は病態のごく初期にいったん肥大化して軟

骨組織容量が増加するものの (J Rheum 1991;18(3):1905-1915)、病態の進展とともに軟骨基質の変性・破壊が進行して容量は減少する (Arthritis Rheum 2004; 50(2):476-487)。このとき、関節軟骨細胞の数はアポトーシスにより減少している (Arthritis Rheum 2004; 50(2):507-515)。一方、残存している個々の関節軟骨細胞はⅩ型コラーゲンを発現して肥大軟骨細胞に分化し、一時性軟骨の性質をもつことが知られている (Arthritis Rheum 1992;35(7):806-811)。また、関節軟骨の破壊に伴い関節炎症も生じており、臨床的に罹患関節における疼痛の要因であると考えられている (J Rheumatol. 2001;28(6):1330-1337)。変形性関節症におけるこれらの変化の抑制、すなわち関節軟骨基質および関節軟骨細胞数の減少抑制又は復元、および関節炎抑制は、治療薬開発において有用であると考えられる。

本発明の目的は、変形性関節症を含む関節炎症に対する新しい治療剤又は予防剤、あるいは該関節炎症の治療方法、を提供することである。

本発明の別の目的は、関節軟骨細胞の増殖を促進する薬剤又は方法を提供することである。

本発明の別の目的は、変形性関節症を含む関節炎症を抑制する方法を提供することである。

本発明の別の目的は、関節炎症治療剤のスクリーニング方法を提供することである。

本発明の別の目的は、関節軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法を提供することである。

発明の概要

本発明者らは、グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質の一種である C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) を過剰発現する CNP トランスジェニックマウスを作製し、関節軟骨への影響を検証した結果、CNP トランスジェニックマウスでは、関節軟骨の厚さおよび関節軟骨細胞数が有意に増加していること、さらに CNP トランスジェニックマウスを用いて作製した変形性関節症モデルでは関節腫脹に抵抗性であることおよび関節軟骨変性が抑制されること、滑膜細胞増勢、肉芽組織

形成、炎症性細胞浸潤の変化が著しく弱いこと、関節軟骨中のプロテオグリカン含量は低下しなかったこと、これに対し、正常マウスを用いた変形性関節症モデルでは、滑膜細胞増勢、肉芽組織形成、炎症性細胞浸潤の変化が顕著であったことを見出した。これらの知見から、本発明者らは、GC-B 活性化物質が関節炎抑制作用と関節軟骨に対する同化的作用の両者を併せもつことを見出した。

したがって、本発明は、以下の発明からなる。

本発明は、第 1 の態様において、グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節炎症の治療剤又は予防剤を提供する。

本発明の一の実施態様において、上記関節炎症が変形性関節症である。

本発明の別の実施態様において、上記変形性関節症が荷重関節の変形性関節症又は非荷重関節の変形性関節症である。

本発明の別の実施態様において、上記変形性関節症が変形性膝関節症である。

本発明の別の実施態様において、上記変形性関節症が変形性股関節症である。

本発明の別の実施態様において、上記変形性関節症が顎関節症である。

本発明の別の実施態様において、上記関節炎症が関節リウマチに起因するものである。

本発明の別の実施態様において、上記関節炎症が変形性関節症に起因するものである。

本発明の別の実施態様において、上記 GC-B 活性化物質が、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) 又はその誘導体である。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択されるものである。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである。

本発明の別の実施形態において、上記関節炎症の治療剤又は予防剤が、少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬をさらに含むものである。

本発明はさらに、第 2 の態様において、GC-B 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節軟骨細胞増殖促進剤を提供する。

本発明の一の実施態様において、上記 GC-B 活性化物質が、CNP 又はその誘導体である。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである。

本発明の別の実施形態において、上記関節軟骨細胞増殖促進剤が、少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬をさらに含むものである。

本発明はさらに、第 3 の態様において、GC-B を活性化することによって関節炎症を抑制することを特徴とする、関節炎症の抑制方法を提供する。

本発明の一の実施態様において、上記 GC-B は、CNP 又はその誘導体によって活性化される。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである。

本発明の別の実施態様において、上記 GC-B が、CNP 又はその誘導体と少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬との組み合わせによって活性化される。

本発明はさらに、第 4 の態様において、GC-B を活性化することによって関節軟骨細胞の増殖を促進することを特徴とする、関節軟骨細胞の増殖促進方法を提供する。

本発明の一の実施態様において、上記 GC-B は、CNP 又はその誘導体によって活性化される。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである。

本発明の別の実施態様において、上記 GC-B が、CNP 又はその誘導体と少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬との組み合わせによって活性化される。

本発明はさらに、第 5 の態様において、GC-B の活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、関節軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法を提供する。

本発明の一の実施態様において、GC-B を発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞の GC-B 活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

本発明の別の実施態様において、上記 GC-B の活性が、細胞内 c GMP 産生量として測定される。

本発明の別の実施態様において、上記方法は、GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

本発明はさらに、第 6 の態様において、GC-B の活性を指標として、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤のスクリーニング方法を提供する。

本発明の一の実施態様において、GC-B を発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞の GC-B 活性を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

本発明の別の実施態様において、前記 GC-B の活性が、細胞内 c GMP 産生量として測定される。

本発明の別の実施態様において、上記方法は、GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

本発明はさらに、第 7 の態様において、GC-B 活性化物質を有効成分として含む、変形性関節症の治療剤又は予防剤を提供する。

本発明の実施態様において、上記変形性関節症の治療剤又は予防剤が、少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬をさらに含むものである。
本発明はさらに、第 8 の態様において、GC-B 活性化物質を有効成分として含む、関節リウマチの治療剤又は予防剤を提供する。

本発明の実施態様において、上記関節リウマチの治療剤又は予防剤が、少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬をさらに含むものである。

本発明はさらに、第 9 の態様において、非ステロイド性活性化剤を含む、グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質に対する活性化促進剤を提供する。

本発明の実施態様において、上記 GC-B 活性化物質が、CNP 又はその誘導体である。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択される。

本発明の別の実施態様において、上記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性

を有するものである。

本発明の別の実施態様において、上記非ステロイド性活性化剤がシクロオキシゲナーゼ酵素抑制剤である。

本発明の別の実施態様において、上記シクロオキシゲナーゼ酵素抑制剤がインドメタシン、イブプロフェン、ピロキシカム、サリチル酸、ジクロフェナク、ケトプロフェン、ナプロキセン及びピロキシカムからなる群より選択される。

本発明はさらに、第 10 の態様において、上記の活性化促進剤を使用することを特徴とする、GC-B 活性化物質の活性化方法を提供する。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2004-107924 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、CNP トランスジェニックマウス作製用ベクターの構築を示す。図 1 A : pGEM-T Easy ベクターに組み込まれたマウス CNP の cDNA を Pst I で切り出し両末端を平滑化した。図 1 B : pSG1 を Eco RI で処理して断端を平滑化した。図 1 C : 図 1 A で得られたマウス CNP の cDNA を図 1 B で得られた pSG1 に組み込んだ。

図 2 は、インジェクション用 DNA フラグメントを示す。図 1 C の pSG1-CNP から、HindIII および XhoI で処理した後、CNP 遺伝子を含む断片(約 2.3kb)を切り出し、インジェクション用のフラグメントとした。

図 3 は、サザンブロット法による導入遺伝子の存在に関する CNP トランスジェニックマウスの遺伝子型解析結果を示す。野生型マウス (WT) では 3 本のシグナル (野生型 CNP 遺伝子) が検出され、トランスジェニックマウス (Tgm) で野生型 CNP 遺伝子に加えて、導入遺伝子由来のシグナル (トランスジーン) が 2 本検出された。

図 4 は、CNP トランスジェニックマウスにおける関節軟骨の肥厚を示す。大腿骨膝蓋面の関節軟骨の厚さについて、正常同腹仔 (Wild) と CNP トランスジェニックマウス (CNP tgm) の間で比較した。CNP トランスジェニックマウスは統計学的に有意に関節軟骨が厚いことを示している。**: $p < 0.01$ 、対応のない Student の t 検定。

図 5 は、CNP トランスジェニックマウスにおける関節軟骨細胞数の増加を示す。大腿骨膝蓋面の関節軟骨における光学顕微鏡下（対物 10 倍）1 視野あたりの軟骨細胞数について、正常同腹仔 (Wild) と CNP トランスジェニックマウス (CNP tgm) の間で比較した。CNP トランスジェニックマウスは統計学的に有意に 1 視野あたりの軟骨細胞数が多いことを示す。*: $p < 0.05$ 、対応のない Student の t 検定。

図 6 は、CNP トランスジェニックマウスのコラゲナーゼ OA モデルにおける関節腫脹抵抗性を示す。CNP トランスジェニックマウス (Tgm) および野生型マウス (WT) の右膝関節に 3% コラゲナーゼ生理食塩液を投与後、左右の膝関節幅を計測し、その左右差を膝関節腫脹の指標として推移 (図 6 A) とその曲線下面積 (AUC) (図 6 B) を評価した。CNP トランスジェニックマウスは右膝関節の腫脹が弱い傾向にあり、AUC は野生型に対して有意に小さかった。**: $p < 0.01$, N. S.: 有意差なし。対応のない Student の t 検定。

図 7 は、コラゲナーゼ OA モデルにおける右膝関節滑膜の組織学的変化を示す。CNP トランスジェニックマウスおよび野生型マウスの右膝関節に 3% コラゲナーゼ生理食塩液を投与後、28 日での右膝関節滑膜の組織像である。野生型マウスに 3% コラゲナーゼを投与すると、滑膜上皮細胞の増生、肉芽組織形成および炎症性細胞浸潤が認められた (図 7B)。一方、CNP トランスジェニックマウスではこれら所見はきわめて軽微であった (図 7C)。図 7 A は正常滑膜組織を示す。

図 8 は、コラゲナーゼ OA モデルにおける右大腿骨内顆関節軟骨の組織学的変化を示す。CNP トランスジェニックマウスおよび野生型マウスの右膝関節に 3% コラゲナーゼ生理食塩液を投与後、28 日での右大腿骨内顆関節軟骨の組織像である。野生型マウスでは軟骨基質のサフラニン O 染色性が低下し、プロテオグリカン含量低下が認められた (図 8B) のに対し、CNP トランスジェニックマウスではサフラニン O 染色性は保たれていた (図 8C)。図 8 A は正常関節軟骨を示す。

図 9 は、Infusion 投与した CNP のマウスコラゲナーゼ OA モデルにおける関節腫脹抑制効果を示す。C57BL/6 J Jc1 系マウスに CNP-22 を皮下に持続投与し、右膝関節に 1.5% コラゲナーゼ生理食塩液を投与して 6 日後に測定した右膝関節腫脹を示す。CNP-22 は 60, 600 ng/日群ともに溶媒対照群 (ビヒクル) に対して有意に右膝関節の腫脹を抑制した。対応のない Student の t 検定。

図 1 0 は、Infusion 投与した CNP のマウス外科的 OA モデルにおける関節腫脹抑制効果を示す。C57BL/6 J Jcl 系マウスに CNP-22 を皮下に持続投与し、右膝関節に前十字靱帯切除、内側側副靱帯切除および内側半月板全切除の外科処置を加えて変形性関節症を惹起した。術後 4、8、11 日後に左右膝関節幅を測定、その差の AUC を示した。CNP-22 は 60、600 ng/日群ともに溶媒対照群（ビヒクル）に対して有意に右膝関節の腫脹を抑制した。対応のない Student の t 検定。

図 1 1 は、C57BL/6 J Jcl 系マウスコラゲナーゼ OA モデルにおける膝関節腫脹に対する、CNP-22（6 ng/日、皮下持続投与）、インドメタシン（Indo., 1 mg/kg、経口投与）、およびこれらを併用した場合の抑制効果を示す。図 11A はマウス右膝関節に 0.15%と 1.5% コラゲナーゼ生理食塩液を投与したあとの 7 日間の経日的な右膝関節腫脹推移を表す。図 11B は、図 11A のグラフの曲線下面積（AUC）を表す。AUC の比較において、CNP-22 は溶媒対照群（ビヒクル）に対して有意に右膝関節の腫脹を抑制したが、インドメタシンは抑制しなかった。一方、CNP-22 とインドメタシンを併用した群は顕著な抑制を示し、CNP-22 単独群に対しても有意な抑制を示した。対応のない Student の t 検定。* : $p < 0.05$ (vs. ビヒクル), ** : $p < 0.01$ (vs. ビヒクル)。

図 1 2 は、ラットアジュバント関節炎モデルに対する、CNP-22 の四肢末端の関節炎と体重推移に対する効果を示す。図 12A は四肢末端の関節炎スコアの推移を表しており、CNP-22 群では関節炎スコアが低い傾向が認められる。図 12B は体重の推移を表しており、抗原感作後 7、10 日において CNP-22 群が溶媒対照群（ビヒクル）に比して有意に体重が重いことが示されている。対応のない Student t 検定。* : $p < 0.05$ (vs. ビヒクル)。

図 1 3 は、ラットコラーゲン関節炎モデル体重に対する CNP-22 の作用を示す。正常群に対して、溶媒対照群（ビヒクル）は抗原感作後 21、24、28 日で有意に体重が軽かったが、このとき CNP-22 群（CNP 6 μ g/日）では溶媒対照群に対して有意に体重が重かったことが示されている。対応のない Student t 検定。## : $p < 0.01$ (vs. 正常), * : $p < 0.05$ (vs. ビヒクル)。

発明の詳細な説明

図面を参照しながら、本発明をさらに具体的に説明する。

本発明者らが後述の実施例 2 に記載のように作製した CNP-トランスジェニックマウス (CNPTgm) についてサザンブロット法を用いて遺伝子型解析を行ったところ、図 3 に示されるように、野生型マウスでは 3 本のシグナル (野生型 CNP 遺伝子) が検出され、CNPTgm では野生型 CNP 遺伝子に加えて、導入遺伝子由来の 2 本のシグナル (トランスジーン) が検出された。CNPTgm での CNP の発現を検討するため、導入した遺伝子の高発現が予想される臓器である肝臓および血漿での CNP の濃度を調べたところ、CNP Tgm は野生型に対し、肝臓で約 10 倍、血漿で約 24 倍の CNP 濃度を示しており、統計学的に有意に CNP ペプチドが過剰発現されていることが確認された (実施例 4 の表 1)。

さらに CNPTgm の関節軟骨の組織学的解析を行うために、関節軟骨の厚さおよび軟骨細胞数を組織学的に調べたところ、関節軟骨の厚さは、CNPTgm において統計学的に有意に厚いこと (図 4)、また関節軟骨細胞数も CNPTgm において統計学的に有意に多いこと (図 5) が確認された。これらの結果から、CNP などの GC-B 活性化物質は軟骨細胞数を増加させることによって関節軟骨の厚さを増加させることが示された。

後述の実施例 6 では、マウスを用いて膝関節内へのコラゲナーゼ注射により膝関節の靱帯および半月板を不安定化させて変形性関節症を惹起する変形性関節炎病態モデル動物を作製した (Am. J. Pathol. 1989;135:1001-14)。CNPTgm の関節炎症および関節軟骨変性に対する抵抗性を評価する目的で、CNPTgm および正常マウスを用いて作製した各変形性関節炎モデル動物を用いて検討を行ったところ、CNPTgm を用いて作製したモデル動物では、正常マウスを用いて作製したモデル動物と比べて、膝関節腫脹が有意に小さかったこと、関節軟骨変性が有意に抑制されていたこと、滑膜における滑膜細胞増勢、肉芽組織形成、炎症性細胞浸潤の変化が著しく弱かったこと、および関節軟骨中のプロテオグリカン含量にはほとんど変化はなかったことが確認された (図 6 ~ 図 8)。これらの結果から、GC-B 活性化物質が、変形性関節症において関節炎症抑制作用と関節軟骨変性抑制作用を有することが判明した。

さらにまた、オスモティックポンプを移植した正常マウスを用いて、変形性関

節炎モデルを作製し、インフュージョン投与した CNP の変形性関節炎モデルに対する治療効果の検討を行った。CNP 投与群では膝関節腫脹に抵抗性であること、関節軟骨変性が有意に抑制されていたこと、滑膜における滑膜細胞増勢、肉芽組織形成、炎症性細胞浸潤の変化が著しく弱かったことが確認された(図 9)。これらの結果から、GC-B 活性化物質は変形性関節症に対する治療効果を有することが判明した。

さらに、オスモティックポンプを移植した正常マウスの右膝関節に対して前十字靭帯切断、内側側副靭帯切断および内側半月板全切除の外科処置を施し、変形性関節症を惹起し、インフュージョン投与した CNP の変形性関節炎モデルに対する治療効果の検討を行った。その結果、CNP 投与群の AUC (曲線下面積) はいずれの用量とも溶媒対照群に対し有意に小さかったことが確認された(図 10)。この結果から、GC-B 活性化物質が外科処置により惹起される、膝関節への物理的過荷重にもとづく変形性関節症における関節炎症に対しても抑制作用を有することが明らかになった。

さらにまた、コラゲナーゼ OA モデルマウスに、CNP を単独でまたは非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) と併用して投与したとき、使用した NSAID 単独では膝関節腫脹を抑制しなかったが、CNP 単独投与では有意に膝関節腫脹を抑制し、CNP と NSAID との併用投与では、より大きい相乗的腫脹抑制効果を示すことが判った(実施例 9、図 11)。

さらにまた、関節リウマチ (RA) モデルとしてラボで汎用されているアジュバント関節炎モデルおよびコラーゲン関節炎モデル (Arthritis & Rheumatism, 27:797-806, 1984; British Journal of Rheumatology, 33:798-807, 1994) を用いて、CNP の効果をさらに調べた結果、CNP 投与群 (ラット) では、関節炎が有意に抑制されるとともに、対照と比べて体重増加が観察され、一般状態の有意な改善が認められた (実施例 10、11、及び図 12、13)。これらの結果は、CNP が関節リウマチによる関節炎に対して効能があることを示している。

このような実証例に基づき、本発明者らは、特定の理論や特定の実験例に拘束されることなく、CNP などの GC-B 活性化物質が関節炎症抑制作用と関節軟骨に対する同化的作用の両者を併せもつことを見出した。

したがって、本発明は、GC-B 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節炎症の治療剤又は予防剤を提供する。

本発明において治療又は予防可能な関節炎症は、特に関節軟骨に関わる疾患であり、例えば、変形性関節症に起因する関節炎症、滑膜炎、関節リウマチ（例えば慢性関節リウマチ(成人)や若年性関節リウマチ(子供)）、骨関節炎、全身性エリテマトーデス（SLE）、痛風、強皮症、乾癬(乾癬性関節炎)、プラストミセス症などの真菌感染、強直性脊椎炎、ライター症候群、敗血症性関節炎、成人スティル病、第三次ライム病(後期)、結核(結核性関節炎)、ウイルス感染(ウイルス性関節炎)、淋疾（淋菌性関節炎）もしくはバクテリアによる感染(非りん菌性細菌性関節炎)などに起因する関節炎症が含まれるが、これらに限定されない。

本発明の実施態様において、好ましい関節炎症は変形性関節症、あるいは、変形性関節症に起因する関節炎症である。

変形性関節症は、関節軟骨の変性と破壊に起因する疾患であり、適応可能な変形性関節症には例えば、(1)荷重関節である膝関節、股関節、足関節、脊椎などにおける変形性膝関節症、変形性股関節症、変形性足関節症、及び変形性脊椎症などの荷重関節における変形性関節症、並びに(2)非荷重関節である肩関節、肘関節、手関節、顎関節などにおける変形性肩関節症、変形性肘関節症、変形性手関節症(例えばヘバーデン結節、ブシャール結節、変形性母指 CM 関節症など)、顎関節症などの非荷重関節における変形性関節症が含まれる。

本発明の実施態様において、変形性関節症は、荷重関節における変形性関節症であり、好ましくは変形性膝関節症及び変形性股関節症である。

本発明の別の実施態様において、変形性関節症は、非荷重関節における変形性関節症であり、好ましくは顎関節症である。

本発明の治療剤又は予防剤はまた、関節リウマチの治療又は予防にも適応可能である。関節リウマチは、自己免疫疾患であると考えられており、変形性関節症とは病因を異にするが、その病状の進行に伴って変形性関節症と同様に関節軟骨表面の変性と軟骨の破壊が起こる。このため、本発明の治療剤を投与することによって、関節炎症を抑制又は軽減することができる。

本明細書中で使用する「治療」、「治療方法」、「治療剤」なる用語は、本発明に

係る関節炎症をもつ患者の症状を除去、抑制又は軽減すること、あるいはそのための方法又は医薬を意味する。また、「予防」、「予防剤」なる用語は、関節炎症を予防すること、あるいはそのための医薬を意味する。

本発明においてグアニルシクラーゼ B (GC-B) とは、ナトリウム利尿ペプチド受容体 B (NPR-B) と同義の用語として使用する。

本発明において GC-B 活性とは、グアニルシクラーゼ活性と同義の用語として使用する。本発明において、グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質又は GC-B 活性化物質は、CNP の受容体として知られる GC-B と結合してこれを活性化するペプチド又は非ペプチド性低分子化合物であり、好ましくは CNP ペプチド又はその誘導体である。ここでペプチドは、複数の (L-、D-及び/又は修飾) アミノ酸のアミド結合連鎖からなる物質を指し、この中にはポリペプチド及び蛋白質も包含される。GC-B 活性化物質は、例えば、COS-7 等の培養細胞株に GC-B 受容体を発現させ、培地に候補薬剤を添加し、一定の温度及び一定の時間 (例えば 37℃、5 分後) 細胞株を培養したのち、細胞内の c GMP 産生量を測定する方法 (Science 1991; 252: 120-123) によって同定されうる。すなわち、このようなアッセイ系を使用して細胞内 c GMP の産生量を指標として GC-B 活性化物質を同定し、それを本発明に使用することができる。

本発明の実施態様において、GC-B 活性化物質は、ペプチドであり CNP 又はその誘導体である。好ましい CNP は、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択されるものであり、さらに好ましくは、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である。

本発明の別の実施態様において、上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである。あるいは、上記 CNP 誘導体は、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列と約 70% 以上、約 80% 以上、約 85% 以上、約 90% 以上、約 95% 以上、約 97% 以上、約 98% 以上、約 99% 以上の % 同一性を有する配列を含みかつ CNP 活性を有するものである。

本明細書中で使用される「1～数個」という用語は、通常 1～10、好ましくは 1～5、さらに好ましくは 1～3 の任意の整数を表す。また、2 つのアミノ酸配

列間の「%同一性」は、当業者に公知の BLAST タンパク質検索などの手法を用いて決定することができる (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic Local Alignment Search Tool" J. Mol. Biol. 215:403-410)。

本発明で使用可能な CNP には、ヒトを含む哺乳類由来 CNP (CNP-22: Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990; 168: 863-870, 国際公開 W091/16342、CNP-53: Biochem. Biophys. Res. Commun. 1990; 170: 973-979, 特開平 4-74198 号公報、特開平 4-139199 号公報、特開平 4-121190 号公報)、鳥類由来 CNP (特開平 4-120094 号公報)、両生類由来 CNP (特開平 4-120095 号公報)、並びに、特開平 6-9688 号公報、国際公開 W002/074234 に開示される CNP 類似体ペプチドのような CNP 誘導体が含まれる。

天然由来 CNP として、22 及び 53 アミノ残基からなる CNP-22 及び CNP-53 が知られており、鳥類及びヒトを含む哺乳類由来の各 CNP を比較すると種を超えて配列相同が高いため、本発明においては、鳥類又はヒトを含む哺乳類由来の CNP、好ましくはヒトを含む哺乳類由来の CNP、さらに好ましくはヒト由来の CNP が使用されうる。ヒト CNP-22 及び CNP-53 のアミノ酸配列は、下記の配列番号 1 及び配列番号 2 :

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys (ヒト CNP-22: 配列番号 1) ;

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys (ヒト CNP-53: 配列番号 2)

として示される配列を有しており、いずれも分子内ジスルフィド結合を有し、すなわちヒト CNP-22 では 6 位のシステイン残基と 22 位のシステイン残基との間で、またヒト CNP-53 では 37 位のシステイン残基と 53 位のシステイン残基との間でそれぞれ分子内ジスルフィド結合を有し、環状ペプチド構造を形成している。

ブタ CNP-22 及びラット CNP-22 は、ヒト CNP-22 と同一のアミノ酸配列を有するが、一方、ブタ CNP-53 及びラット CNP-53 では 17 位及び 28 位のアミノ酸残基が

それぞれ His 及び Gly であるのに対しヒト CNP-53 ではそれぞれ Gln 及び Ala であり、2つのアミノ酸が相違する（特開平 4-139199 号公報、特開平 4-121190 号公報、特開平 4-74198 号公報）。さらにまた、ニワトリ CNP-22 は、9 位のアミノ酸残基 Val のみがヒト CNP-22 と異なる以外は同じ一次構造を有している（特開平 4-120094 号公報）。

本発明で使用する上記 CNP は、天然からの精製 CNP、既知の遺伝子工学的手法で製造された遺伝子組換え CNP、既知の化学合成法（例えばペプチド合成機を用いる固相合成法）で製造された CNP を含み、好ましくは遺伝子工学的手法で製造されたヒト CNP-22 およびヒト CNP-53 である。遺伝子工学的手法によるヒト CNP の製造は、例えば、ヒト CNP-22 又は CNP-53 の DNA 配列（特開平 4-139199 号公報）をプラスミド、ファージなどのベクターに組み込み、大腸菌や酵母などの原核もしくは真核生物宿主細胞に形質転換したのち、適する培地中で発現し、好ましくは細胞外に CNP ペプチドを分泌させ、産生した CNP ペプチドを回収し精製する各工程を含む。また、目的 DNA の増幅のために、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術を使用することができる。

遺伝子組換え技術、部位特異的突然変異誘発法、PCR 技術などの基本的な手法は当業者には公知であり、例えば J. Sambrook ら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); Ausubel ら、Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons (1998)などに記載されており、そこに開示される技術を本発明のために利用することができる。またベクターとしては、市販のベクターあるいは刊行物記載のベクターが使用できる。

本発明で使用する CNP 誘導体は、CNP 活性を有するとともに、ヒト CNP-22 又は CNP-53 と同一の 2 つのシステイン残基間のジスルフィド結合による環状ペプチド構造を有するものであって、上記 CNP のフラグメント、上記 CNP 又はそのフラグメントの構成アミノ酸の少なくとも 1 つをその他のアミノ酸に置換したペプチド、上記 CNP そのもの又はその部分ペプチドの構成アミノ酸の少なくとも 1 つを欠失したペプチド、及び上記 CNP そのもの又はその部分ペプチドの構成アミノ酸に 1 つ以上のアミノ酸を付加したペプチドを含む。アミノ酸の置換、欠失、付

加とは、CNP 活性を損なわない限り、部位特異的突然変異誘発法などの周知の方法にてアミノ酸の置換、欠失又は付加できる程度の数のアミノ酸が置換、欠失又は付加されることを意味する。このような CNP-22 又は CNP-53 の誘導体は例えば、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 ～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである。

アミノ酸の置換については、一般的に保存的アミノ酸置換が好ましい。保存的アミノ酸は、例えば極性度（または疎水性度）や電荷の種類によって分類されることができる。例えば、非極性の非電荷型アミノ酸にはグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリンなど、芳香族アミノ酸にはフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、極性の非電荷型アミノ酸にはセリン、トレオニン、システイン、メチオニン、アスパラギン、グルタミンなど、負電荷アミノ酸にはアスパラギン酸、グルタミン酸、正電荷アミノ酸にはリジン、アルギニン、ヒスチジンが、それぞれ含まれる。

本発明において CNP 活性とは、GC-B に作用してグアニルシクラーゼ活性を上昇させる活性や変形性関節症を含む関節炎症を除去、抑制又は軽減する活性あるいは関節軟骨の増殖を促進させる活性をいう。CNP 活性は、細胞のグアニルシクラーゼ活性、たとえば細胞内 c GMP の産生量を測定することによること、及び/又は、マウス、ラットなどの関節炎症、変形性関節症もしくは関節リウマチモデル動物に一定期間 CNP 又はその誘導体を投与したのち、後述の実施例 7 から 10 に記載されるように関節炎症抑制効果又は関節軟骨変性抑制効果の程度を測定すること、によって決定しうる。

CN-22 類似ペプチドには、例えば特開平 6-9688 号公報や国際公開 W002/074234 に記載されるような下記の環状ペプチドが含まれる（なお、配列中の下線はヒト CNP-22 からの変異を表す）。

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala Met Ser Gly
Leu Gly Cys(配列番号 3)

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly
Leu Gly Cys(配列番号 4)

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Ala Ser Gly

Leu Gly Cys(配列番号 5)

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys(配列番号 6)

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys(配列番号 7)

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr(配列番号 8)

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr(配列番号 9)

Cys Phe Gly Xaa Xbb XccAsp Arg Ile Gly Xdd Xee Ser Xff Xgg Gly Cys

(ここで、Xaa=Leu, Ile, Val; Xbb=Lys, Leu, Met; Xcc=Leu, Ile, Ala, Val; Xdd=Ser, Ala, Gly, Thr, Asn; Xee=Met, Ala, Trp, His, Lys, Ser, Gly; Xff=Gly, Lys, Ala, Leu; Xgg=Leu, Met である。)(配列番号 10)

また、CNP-53 類似ペプチドには、上記の CNP-22 類似ペプチドに対応するアミノ酸の同様の変異を含む環状ペプチドが含まれる。

本発明はさらに、GC-B 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節軟骨細胞増殖促進剤を提供する。この発明は、GC-B 活性化物質が関節軟骨細胞を増加させる働きがあることに基づく。GC-B 活性化物質の具体例は、上記定義の CNP 又はその誘導体である。CNP は、好ましくは、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 であり、さらに好ましくは、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である。また、CNP 誘導体は、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものを含む。他の GC-B 活性化物質は、例えば、COS-7 等の培養細胞株に GC-B 受容体を発現させ、培地に候補薬剤を添加し、一定の温度及び一定の時間(例えば 37℃、5 分後)細胞株を培養したのち、細胞内の c GMP 産生量を測定する方法(Science 1991; 252: 120-123)によって同定されうる。すなわち、このようなアッセイ系を使用して細胞内 c GMP の産生量を指標として GC-B 活性化物質を同定し、それを本発明に使用することができる。

本発明はまた、GC-B を活性化することによって関節炎症を抑制することの特徴

とする、関節炎症の抑制方法を提供する。さらに本発明は、GC-B を活性化することによって関節軟骨細胞の増殖を促進することを特徴とする、関節軟骨細胞の増殖促進方法を提供する。これらの発明は、GC-B 活性化物質によって、言い換えれば GC-B を活性化することによって、上記定義の関節炎症、好ましくは変形性関節症を抑制することができるという知見、また関節軟骨細胞の増殖を促進するという知見に基づく。本発明の実施態様により、GC-B は、上記定義の CNP 又はその誘導体によって活性化されうる。

本発明はさらに、GC-B の活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、関節軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法を提供する。GC-B は、グアニルシクラーゼ活性により GTP からセカンドメッセンジャーである c GMP の合成を触媒することが知られているので、GC-B の活性は、細胞内 c GMP 産生量として測定されうる。

本発明の実施態様において、上記スクリーニング方法は、GC-B を発現する細胞や関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞のグアニルシクラーゼ活性、たとえば細胞内 c GMP の産生量を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることからなる工程を含むことができる。

本発明の実施態様においてより好ましくは、GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

本発明のスクリーニング方法は、例えば、COS-7 等の培養細胞株に GC-B を発現させ、培地に候補薬剤を添加し、一定の温度及び一定の時間(例えば 37°C、5 分間)細胞株を培養したのち、細胞内の c GMP 産生量を測定する方法(Science 1991; 252: 120-123)によって関節軟骨細胞増殖促進剤をスクリーニングすることができる。

本発明はさらに、GC-B の活性を指標として、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、変形性関節症、

関節リウマチあるいは関節炎症治療剤のスクリーニング方法を提供する。上記と同様に、GC-B の活性は、グアニルシクラーゼ活性、たとえば細胞内 c GMP 産生量として測定されうる。

本発明の実施態様において、上記スクリーニング方法は、GC-B を発現する培養細胞や関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞のグアニルシクラーゼ活性、たとえば細胞内 c GMP の産生量を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることからなる方法を含むことができる。

本発明の実施態様においてより好ましくは、GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む。

本発明のスクリーニング方法は、例えば、COS-7 等の培養細胞株に GC-B を発現させ、培地に候補薬剤を添加し、一定の温度及び一定の時間(例えば 37℃、5 分間)細胞株を培養したのち、細胞内の c GMP 産生量を測定する方法(Science 1991; 252: 120-123)によって変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤をスクリーニングすることができる。

本発明の変形性関節症等の関節炎症の治療剤又は予防剤は、有効成分としての上記定義の GC-B 活性化物質を、製薬上許容可能な担体、賦形剤、添加剤などと組み合わせて、経口投与用又は非経口投与用に製剤化される。

製剤用の担体や賦形剤としては、例えば、乳糖、ステアリン酸マグネシウム、デンプン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ゴマ油、カカオバター、エチレングリコールなどやその他常用されるものをあげることができる。

経口投与のための固体組成物としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤などが用いられる。このような固体組成物においては、少なくともひとつの有効成分が少なくともひとつの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶性セルロース、デンプン、ポリ

ビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は、常法にしたがって不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、グルタミン酸又はアスパラギン酸のような溶解補助剤を含んでいてもよい。錠剤又は丸剤は、必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどの糖衣や胃溶性又は腸溶性物質のフィルムで被覆してもよいし、2つ以上の層で被覆してもよい。さらに、ゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも含まれる。

経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤などを含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールなどを含んでいてもよい。この組成物は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤などを含んでいてもよい。

非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤が含まれる。水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、注射用水及び注射用生理食塩液が含まれる。非水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート 80（登録商標）などが含まれる。このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、乳糖）、溶解補助剤（例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸）のような補助剤を含んでいてもよい。これらは、例えば、精密ろ過膜によるろ過滅菌、高圧蒸気滅菌のような加熱滅菌、あるいは、殺菌剤の配合などの通常の滅菌方法によって無菌化することが可能である。注射剤は溶液製剤であっても、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥のための賦形剤としては例えばマンニトール、ブドウ糖などの糖アルコールや糖類を使用することができる。

本発明の治療剤又は予防剤は、医薬に一般に使用されている経口投与方法又は非経口投与方法のいずれかによって投与される。好ましくは非経口投与方法、例えば注射による投与（皮下注射、静脈注射、筋肉注射、腹腔内への注射などによ

る投与)、経皮投与、経粘膜投与(経鼻投与、経直腸投与など)、経肺投与などであるが、経口投与方法による投与も可能である。

本発明の製剤中に含まれる有効成分である GC-B 活性化物質、好ましくは上記定義の CNP 又はその誘導体、の量は、治療すべき疾患の種類、疾患の重症度、患者の年齢などに応じて決定できるが、一般に $0.005 \mu\text{g/kg} \sim 100\text{mg/kg}$ の範囲で投与することができるが、 $0.02 \mu\text{g/kg} \sim 5\text{mg/kg}$ で投与することが好ましい。さらに $0.02 \mu\text{g/kg} \sim 0.25 \text{mg/kg}$ での投与が好ましい。しかしながら本発明の CNP を含有する薬剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

本発明の治療剤又は予防剤は、抗炎症薬、ヒアルロン酸や副腎皮質ステロイドなどの従来又は新規の治療剤と組み合わせたり、また関節鏡視下手術、人工関節置換や骨切り術などの整形外科手術と組み合わせて使用することができる。

特に、抗炎症薬、例えば少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬を GC-B 活性化物質(例えば、上記定義の CNP 又はその誘導体)と併用するときには、関節炎に対する相乗的抑制効果がある(実施例 10)。

本明細書で使用する「非ステロイド性抗炎症薬」は、ステロイド骨格をもたない抗炎症薬を指し、プロスタグランジンの産生に関わるシクロオキシゲナーゼ酵素を抑制する作用をもつものが好ましい。本発明で使用可能な非ステロイド性抗炎症薬には、以下のものに限定されないが、例えばインドメタシン(インダシン(商標)など)、イブプロフェン(ブルフェン(商標)など)、ピロキシカム、サリチル酸、ジクロフェナク(ボルタレン(商標)など)、ケトプロフェン、ナプロキセン、ピロキシカムなどを含む。

さらにまた、上記の GC-B 活性化物質を非ステロイド性抗炎症薬と併用するときの相乗効果は、GC-B 活性化物質を単独に使用したときと比べて GC-B の活性化が促進されること、言い換えれば、上記の非ステロイド性抗炎症薬の有効成分が GC-B 活性化物質による GC-B の活性化の際の活性化促進剤となること、を示している。

したがって、本発明はさらに、非ステロイド性活性化剤を含む、GC-B 活性化物質に対する活性化促進剤を提供する。

GC-B 活性化物質には、上述したような、CNP 又はその誘導体が含まれる。CNP

の例は、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 であり、さらに具体的には、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である。また、CNP の誘導体の例は、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである。

本発明において、上記非ステロイド性活性化剤は、好ましくはシクロオキシゲナーゼ酵素抑制剤である。シクロオキシゲナーゼ酵素抑制剤には、例えばインドメタシン、イブプロフェン、ピロキシカム、サリチル酸、ジクロフェナク、ケトプロフェン、ナプロキセン、ピロキシカムなどが含まれるが、これらに限定されない。

本発明の活性化促進剤の剤型、用量、投与方法は、本発明の治療剤及び予防剤について上で説明した事項をそのまま適用できる。

本発明はまた、上記の活性化促進剤を使用することを特徴とする GC-B 活性化物質の活性化方法も提供する。

上記の本発明の活性化促進剤および方法は、患者において、例えば GC-B 活性化を介して関節炎症などの疾患を治療する場合などに有効に使用することができる。

本発明として以下の事項を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

(1) グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節炎症の治療剤又は予防剤。

(2) 上記関節炎症が変形性関節症である、上記(1)に記載の治療剤又は予防剤。

(3) 上記変形性関節症が荷重関節の変形性関節症又は非荷重関節の変形性関節症である、上記(2)に記載の治療剤又は予防剤。

(4) 上記変形性関節症が変形性膝関節症である、上記(3)に記載の治療剤又は予防剤。

(5) 上記変形性関節症が変形性股関節症である、上記(3)に記載の治療剤又は予防剤。

(6) 上記変形性関節症が顎関節症である、上記(3)に記載の治療剤又は予防剤。

(7) 上記関節炎症が関節リウマチに起因する、上記(1)に記載の治療剤又は予防剤。

- (8) 上記関節炎症が変形性関節症に起因する、上記(1)に記載の治療剤又は予防剤。
- (9) 上記 GC-B 活性化物質が、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) 又はその誘導体である、上記(1)～(8)のいずれかに記載の治療剤又は予防剤。
- (10) 上記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択される、上記(9)に記載の治療剤又は予防剤。
- (11) 上記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、上記(9)に記載の治療剤又は予防剤。
- (12) 上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、上記(9)に記載の治療剤又は予防剤。
- (13) 少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬をさらに含む、上記(1)～(12)のいずれかに記載の治療剤又は予防剤。
- (14) GC-B 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節軟骨細胞増殖促進剤。
- (15) 前記 GC-B 活性化物質が、CNP 又はその誘導体である、上記(14)に記載の増殖促進剤。
- (16) 前記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である、上記(15)に記載の増殖促進剤。
- (17) 前記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、上記(15)に記載の増殖促進剤。
- (18) 前記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、上記(15)に記載の増殖促進剤。
- (19) 少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬をさらに含む、上記(14)～(18)のいずれかに記載の増殖促進剤。
- (20) GC-B を活性化することによって関節炎症を抑制することを特徴とする、関節炎症の抑制方法。
- (21) 前記 GC-B が、CNP 又はその誘導体によって活性化される、上記(20)に記載の抑制方法。

(22) 前記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である、上記(21)に記載の抑制方法。

(23) 前記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、上記(21)に記載の抑制方法。

(24) 前記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、請求項 21 に記載の抑制方法。

(25) 前記 GC-B が、CNP 又はその誘導体と少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬との組み合わせによって活性化される、上記(20)～(24)のいずれかに記載の抑制方法。

(26) GC-B を活性化することによって関節軟骨細胞の増殖を促進することの特徴とする、関節軟骨細胞の増殖促進方法。

(27) 前記 GC-B が、CNP 又はその誘導体によって活性化される、上記(26)に記載の増殖促進方法。

(28) 前記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である、上記(27)に記載の増殖促進方法。

(29) 前記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、上記(27)に記載の増殖促進方法。

(30) 前記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、上記(27)に記載の増殖促進方法。

(31) 前記 GC-B が、CNP 又はその誘導体と少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬との組み合わせによって活性化される、上記(26)～(30)のいずれかに記載の増殖促進方法。

(32) GC-B の活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、関節軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

(33) GC-B を発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞の GC-B 活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、上記(32)に記載のスク

リーニング方法。

(34)前記 GC-B 活性が、細胞内 c GMP 産生量として測定される、上記(32)又は(33)に記載のスクリーニング方法。

(35)GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、上記(32)～(34)のいずれかに記載のスクリーニング方法。

(36)GC-B の活性を指標として、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤のスクリーニング方法。

(37)GC-B を発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞の GC-B 活性を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、上記(36)に記載のスクリーニング方法。

(38)前記 GC-B 活性が、細胞内 c GMP 産生量として測定される、上記(36)又は(37)に記載のスクリーニング方法。

(39)GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、上記(36)～(38)のいずれかに記載のスクリーニング方法。

(40)グアニルシクラーゼ B (GC-B)活性化物質を有効成分として含む、変形性関節症の治療剤又は予防剤。

(41)少なくとも1つの非ステロイド性抗炎症薬をさらに含む、上記(40)に記載の変形性関節症の治療剤又は予防剤。

(42)グアニルシクラーゼ B (GC-B)活性化物質を有効成分として含む、関節リウマチの治療剤又は予防剤。

(43)少なくとも1つの非ステロイド性抗炎症薬をさらに含む、請求項 42 に記載

の、関節リウマチの治療剤又は予防剤。

(44) 関節炎症の治療を必要とする患者に GC-B 活性化物質を投与することを含む、該関節炎症の治療方法。

(45) 上記 GC-B 活性化物質が CNP 又はその誘導体である、上記(44)に記載の治療方法。

(46) 上記関節炎症が変形性関節症である、上記(44)又は(45)に記載の治療方法。

(47) 上記変形性関節症が荷重関節の変形性関節症又は非荷重関節の変形性関節症である、上記(46)に記載の治療方法。

(48) 上記変形性関節症が変形性膝関節症、変形性股関節症又は顎関節症である、上記(47)に記載の治療方法。

(49) 上記関節炎症が関節リウマチに起因する、上記(44)に記載の治療方法。

(50) 上記関節炎症が変形性関節症に起因する、上記(44)に記載の治療方法。

(51) 上記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択される、上記(45)～(50)のいずれかに記載の治療方法。

(52) 上記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、上記(45)～(50)のいずれかに記載の治療方法。

(53) 上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、上記(45)～(50)のいずれかに記載の治療方法。

(54) 上記 GC-B 活性化物質を、少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬と組み合わせて含む、上記(44)～(53)のいずれかに記載の治療方法。

(55) 非ステロイド性活性化剤を含む、GC-B 活性化物質に対する活性化促進剤。

(56) 上記 GC-B 活性化物質が、CNP 又はその誘導体である、上記(55)に記載の活性化促進剤。

(57) 上記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択される、上記(56)に記載の活性化促進剤。

(58) 上記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、上記(56)に記載の活性化促進剤。

(59) 上記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1～数個

のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、上記(56)に記載の活性化促進剤。

(60) 上記非ステロイド性活性化剤がシクロオキシゲナーゼ酵素抑制剤である、上記(55)に記載の活性化促進剤。

(61) 上記シクロオキシゲナーゼ酵素抑制剤がインドメタシン、イブプロフェン、ピロキシカム、サリチル酸、ジクロフェナク、ケトプロフェン、ナプロキセン及びピロキシカムからなる群より選択される、上記(60)に記載の活性化促進剤。

(62) 上記(55)～(61)のいずれかに記載の活性化促進剤を使用することを特徴とする、GC-B 活性化物質の活性化方法。

以下の実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例は単に例示を目的としたものであって、本発明を制限するものではない。それゆえ、本発明は、これらの実施例によって制限されないものとする。

実施例 1

CNP トランスジェニックマウス作製用ベクターの構築

図 1 A に示すように、pGEM-T easy vector (Promega 社製) にマウス CNP cDNA (526 bp; FEBS Lett. 276:209-213, 1990) をサブクローニングさせたものを Pst I で切断し、断端を平滑化してマウス CNP cDNA を調製した。PSG1 ベクター (Promega 社製; 図 1 B) を Eco RI で切断し断端を平滑化して、図 1 C のようにマウス CNP cDNA を ligation し、SAP-mCNP ベクター (pSG1-CNP) を作製した。

実施例 2

CNP トランスジェニックマウスの作製

インジェクション用 DNA フラグメントは、次のようにして調製した。まず CNP 遺伝子を挿入した SAP-mCNP ベクター (pSG1-CNP ; 図 1C) を、HindIII および XhoI で処理した後、CNP 遺伝子を含む断片 (約 2.3kb) を切り出した。この断片を、Gel Extraction Kit (QIAGEN) により回収し、 $3 \text{ ng}/\mu\text{l}$ になるように PBS⁻ で希釈してインジェクション用 DNA フラグメント (図 2) とした。

DNA フラグメントを注入するマウス前核期卵は、次のようにして回収した。す

なわち、まず C57BL/6 雌マウス(日本クレア)に 5 i.u の妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)を腹腔内投与、さらに 48 時間後 5 i.u のヒト絨毛ゴナドトロピン(hCG)を腹腔内投与することによって、過排卵処理した。この雌マウスを同系統の雄マウスと交配させた。交配の翌朝、プラグを確認したマウスの卵管を灌流してマウス前核期卵を回収した。

インジェクション用 DNA フラグメントは、マイクロマニピュレーターを用いて前核期卵へ注入した(ジーンターゲットングの最新技術(羊土社)、190-207、2000)。DNA フラグメントを 660 個の C57BL/6J 胚へ注入し、翌日、2 細胞期に発生していた胚 561 個を、偽妊娠 1 日目の受容雌の卵管に片側当たり 10 個前後(1 匹あたり 20 個前後)を移植した。

分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し里親に哺育させた。136 例の産仔が得られ、そのうちの 5 例が CNP 遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスであった。以下、最初に得られたマウスを Founder と記載する。

Founder は全て雄マウスで、これら 5 ラインのうち 4 ラインから、次世代(F1 マウス)の産仔が得られた。

実施例 3

CNP トランスジェニックマウスの遺伝子型解析

遺伝子型解析は下記に示す手順に従ってサザンブロット法によって行った。3 週齢になったマウスの尾(約 15mm)を採取して proteinase K 処理(55°C、100 rpm で 1 昼夜振盪)して溶解液を得た。この溶解液を核酸自動分離装置(KURABO NA-1000)にかけてゲノム DNA を調製した。ゲノム DNA 15 μ g を Pvu II (200 U)で処理してからフェノール・クロロホルム処理によって制限酵素を除いた後にエタノール沈殿で DNA を回収した。回収された DNA を 25 μ L の TE に溶解して 0.7% アガロースゲル電気泳動(50V 定電圧)にかけ、泳動終了後、ゲルを 0.25 M HCl 溶液で 15 分間処理して DNA を切断し、水洗してから 0.4 M NaOH 溶液でナイロンメンブレンに一晩ブロッティングした。その後、メンブレン上の DNA を UV クロスリンク法で固定した。メンブレンをハイブリダイゼーション溶液(50% Formamide、

0.5 x Denhardt's, 0.5% SDS, 5x SSPE) で処理 (42°C、2 時間) してから、CNP の cDNA (約 0.5kb) を鋳型として BcaBEST Labeling Kit (TaKaRa) で調製した ³²P 標識プローブを加えて 42°C で一晩ハイブリダイゼーションした。その後、洗浄溶液 (2 x SSC, 0.1% SDS) で 55°C、20 分間処理してから Imaging Plate (Fuji Film) に一晩露光し、導入遺伝子のシグナルを BAS2000 (Fuji Film) で検出した (図 3)。野生型マウス (WT) では 3 本のシグナル (野生型 CNP 遺伝子) が検出され、トランスジェニックマウスでは野生型 CNP 遺伝子に加えて、導入遺伝子由来のシグナル (トランスジーン) が 2 本検出された。

実施例 4

CNP トランスジェニックマウスにおける CNP の発現

CNP 濃度の測定には、CNP-22 EIA 測定キット (PHOENIX PHARMACEUTICALS INC. 社製) を用いた。

7 週齢の雌雄 CNP トランスジェニックマウスおよび雌雄の正常同腹マウス各 3 例をエーテル麻酔下で後大静脈から全採血して安楽死させた。

導入した遺伝子の高発現が予想される臓器である肝臓を採取し、肝重量 0.1 g に対して、上記測定キットの EIA assay バッファー 1 mL を加え氷冷した。ワーリングブレンダー (ヒスコトロン社製) でホモジナイズし、遠心分離 (2,000 rpm、5 分間) した上清を CNP-22 濃度測定サンプルとした。

採取した血液に、1 mg のエチレンジアミン 4 酢酸・4 ナトリウム塩 (純正化学社製) と 2 トリプシン阻害単位のアプロチニン (Sigma 社製) を添加して攪拌して血漿を分離し、CNP-22 濃度測定サンプルとした。

測定結果を表 1 に示した。

表 1 CNP トランスジェニックマウスにおける CNP の発現

		肝臓 (ng/g 組織)	平均 ± SD	血漿 (ng/mL)	平均 ± SD
野生型	No.1	38.8	29.3 ± 20.5	0.3	0.3 ± 0.06
	No.2	5.9		0.4	
	No.3	43.3		0.3	
CNP tgm	No.1	293.3	290 ± 81.7**	10.3	8.0 ± 4.7 [#]
	No.2	370.0		11.1	
	No.3	206.7		2.6	

**： $p < 0.01$ (対応のない Student t-test)

#： $p < 0.05$ (Wilcoxon 順位和検定)

CNP トランスジェニックマウス (CNP tgm) は野生型 (Wild type) に対する平均値 ± 標準偏差 (mean ± SD) の比較では肝臓 (Liver) で約 10 倍、血漿 (Plasma) で約 24 倍の CNP-22 濃度を示しており、いずれも統計学的に有意な差であった。これらの結果より、CNP トランスジェニックマウスにおいて、CNP ペプチドが過剰発現されていることが確認された。

実施例 5

CNP トランスジェニックマウス関節軟骨の組織学的解析

関節軟骨の厚さおよび軟骨細胞数を組織学的に解析する目的で、9 週齢の CNP トランスジェニックマウスおよび同腹の正常マウスの雌各 5 例、計 10 例をエーテル麻酔下で後大静脈から全採血して安楽死させ、大腿骨を 20% ホルマリンにより 1 週間固定した。その後 20% EDTA-4Na (純正化学社製) 水溶液 (pH7.4) に浸漬して脱灰した後、大腿骨膝蓋面を正中矢状断して常法に従いパラフィン包埋し、パラフィンブロックを作製した。厚さ 4 mm の切片をマイクロトームを用いて薄切してパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。関節軟骨の厚さは、対物レンズ 10 倍での 1 視野を画像解析ソフト (IPAP, 住化テクノサービス社製) に取り込み、同ソフトを用いて視野中の 5 点について長さを計測して平均値を算出し、その個体の関節軟骨の厚さとした。この計測に用いた同一の視野について、軟骨細胞数を計測した。これら項目について、同性の正常マウスと CNP トランスジェニックマウスの間で平均値および標準偏差を算出し (Microsoft Excel2000, マイクロソフト社製)、対応のない Student の t 検定に

よって統計学的解析を行った (SAS ver. 6.12, SAS インスティテュートジャパン社製)。

関節軟骨の厚さは、雌雄ともに CNP トランスジェニックマウスにおいて統計学的に有意に厚いことが判明した (図 4)。また、1 視野あたりの関節軟骨細胞数も雌雄ともに CNP トランスジェニックマウスにおいて統計学的に有意に多いことが判明した (図 5)。

これらの結果から、CNP などの GC-B(NPR-B)を活性化する物質が、公知である個々の軟骨細胞の肥大化[J Biol Chem 2003;278(21):18824-32]による細胞容積の増加でなく、軟骨細胞数の増加を伴って関節軟骨の厚さを増加させることが明らかになった。

実施例 6

CNP トランスジェニックマウスの変形性関節炎モデルに対する抵抗性

膝関節内へのコラゲナーゼ注射により膝関節の靱帯および半月板を不安定化させ変形性関節症を惹起する変形性関節炎動物モデル[Am J Pathol 1989;135:1001-14]を作成した。CNP の変形性関節炎に対する予防及び治療効果を確認する目的で、CNP トランスジェニックマウスを用いた変形性関節炎動物モデルの関節炎症および関節軟骨変性に対する抵抗性を評価した。CNP トランスジェニックマウスおよび同腹の野生型 C57BL/6 系マウスの右膝関節内に 6 マイクロリットルの 3 % タイプ II コラゲナーゼ (Sigma 社製) 生理食塩溶液を 2 回投与 (投与開始当日と投与開始後 7 日) した。左右の膝関節幅をノギス (ミットヨ社製) を用いて投与後 28 日まで経時的に測定し、左右の差を算出して膝関節腫脹を表す値とした。その経時的推移曲線下面積 (AUC) を台形法により算出し、CNP トランスジェニックマウスと野生型マウスの間で Student t 検定で比較した。その結果、CNP トランスジェニックマウスにおける AUC は野生型よりも有意に小さく、CNP トランスジェニックマウスがコラゲナーゼによる膝関節腫脹に抵抗性であることが判明した (図 6)。関節炎症および関節軟骨変性を病理組織学的に評価するため、コラゲナーゼ投与後 28 日にエーテル麻酔下に全採血による安楽死後に膝関節を採取し、実施例 5 に記載した方法でヘマトキシリン・エオジン染色標本およ

びサフラニン O 染色標本を作成し、組織学的に解析した。その結果、野生型マウスではコラゲナーゼにより滑膜における滑膜細胞増勢、肉芽組織形成、炎症性細胞浸潤が顕著であったのに対し、CNP トランスジェニックマウスではこれら変化が著しく弱かった（図 7）。関節軟骨変性については、野生型マウスではサフラニン O 染色性が低下し、関節軟骨中のプロテオグリカン含量が低下したのに対し、CNP トランスジェニックマウスではその変化は軽微であり、CNP トランスジェニックマウスはコラゲナーゼ投与による関節軟骨変性に抵抗性であることが病理組織学的に示された（図 8）。このとき、血漿中 CNP 濃度を EIA キット（Phoenix Pharmaceutical 社製）を用いて測定したところ、野生型マウスの平均値は 0.21 ng/mL であったのに対し、CNP トランスジェニックマウスでは 0.50 ng/mL であった。

これらの結果から、CNP の変形性関節症における関節炎症抑制作用と関節軟骨変性抑制作用を有することが判明した。

実施例 7

インフュージョン投与した CNP の変形性関節炎モデルに対する治療効果(1)

9 週齢の C57BL/6 J 系の雄マウスの背部皮下に、以下の溶液を含むオスモティックポンプ（2004 型、Durect 社製）を移植した。

- ・溶媒：5 % デキストロース（純正化学社製）、10% マンノース（ナカライテスク社製）および 5 mmol/L 塩酸（和光純薬社製）を含有する蒸留水。
- ・CNP-22（Calbiochem Novabiochem 社製）10 mg/mL 溶液（60 ng/日）。
- ・CNP-22（Calbiochem Novabiochem 社製）100 mg/mL 溶液（600 ng/日）。

移植後 6 日に 1.5% タイプ II コラゲナーゼ（Sigma 社製）溶液 6 mL を右膝関節内に投与し、6 日後まで膝左右の膝関節幅をノギス（ミットヨ社製）を用いて投与後 28 日まで経時的に測定し、左右の差を算出した。この差を膝関節腫脹を表す値とし、その AUC を溶媒対照群と CNP 投与群の間で Student t 検定で比較した（SAS ver. 6.12）。その結果、CNP-22 投与群の AUC はいずれの用量とも溶媒対照群に対し有意に小さかった。また、実施例 5 に記載した方法でヘマトキシリン・エオジン染色標本およびサフラニン O 染色標本を作成し、病理組織学的に解析した。

その結果、溶媒対照群ではコラゲナーゼにより滑膜における滑膜細胞増勢、肉芽組織形成、炎症性細胞浸潤が顕著であったのに対し、CNP 投与群ではこれら変化が著しく弱いことが判明した（図 9）。滑膜組織膝関節のこの結果から、CNP が変形性関節症 に対して治療効果を有することが判明した。

実施例 8

インフュージョン投与した CNP の変形性関節炎モデルに対する治療効果(2)

9 週齢の C57BL/6 J 系の雄マウス（日本クレア社製）の背部皮下に、以下の溶液を含むオスモティックポンプ（2004 型、Durect 社製）を移植した。

- ・溶媒：5 % デキストロース（純正化学社製）、10% マンノース（ナカライテスク社製）および 5 mmol/L 塩酸（和光純薬社製）を含有する蒸留水。
- ・CNP-22（Calbiochem Novabiochem 社製）10 mg/mL 溶液（60 ng/日）。
- ・CNP-22（Calbiochem Novabiochem 社製）100 mg/mL 溶液（600 ng/日）。

移植翌日にマウスをエーテル麻酔し、右膝関節に対して前十字靱帯切断、内側副靱帯切断および内側半月板全切除の外科処置を施し、変形性関節症を惹起した。左右膝関節幅をノギス（ミットヨ社製）を用いて投与後 1 1 日まで経時的に測定し、左右の差を算出した。この差を膝関節腫脹を表す値とし、その AUC を溶媒対照群と CNP 投与群の間で Student t 検定で比較した（SAS 前臨床パッケージ、SAS インスティテュートジャパン社製）。その結果、CNP-22 投与群の AUC はいずれの用量とも溶媒対照群に対し有意に小さかった（図 10）。

この結果から、CNP が外科処置により惹起される、膝関節への物理的過荷重にもとづく変形性関節症における関節炎症に対しても抑制作用を有することが明らかになった。

実施例 9

コラゲナーゼ OA モデルにおける非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) と CNP の併用効果

9 週齢の C57BL/6 J 系の雄マウスの背部皮下に、以下の溶液を含むオスモティックポンプ（2004 型、Durect 社製）を移植した。

・溶媒：5% デキストロース（純正化学社製）、10% マンノース（ナカライテスク社製）および 5 mmol/L 塩酸（和光純薬社製）を含有する蒸留水。

・CNP-22（Calbiochem Novabiochem 社製）1 μ g/mL 溶液（6 ng/日）。

また、NSAID であるインドメタシン（Sigma 社製）の効果と、CNP と併用したときの効果を検討するために、上記のポンプ移植日から 1 日 1 回、連日 4 日間 1mg/kg の用量でインドメタシンの 0.2%カルボキシメチルセルロース（ナカライテスク社製）溶液への懸濁液を強制経口投与した。

実験群は以下の如く設定した。

溶媒対照（インフュージョン溶媒、経口投与溶媒）

CNP 6 ng/日

インドメタシン 1 mg/kg

CNP 6 ng/日 + インドメタシン 1 mg/kg

ポンプの移植当日に 0.15% タイプ II コラゲナーゼ（Sigma 社製）溶液 6 μ L、翌日に 1.5% タイプ II コラゲナーゼ溶液 6 μ L を右膝関節内に投与し、膝左右の膝関節幅をノギス（ミットヨ社製）を用いて投与後 7 日まで経日的に測定し、左右の差を算出した。この差を膝関節腫脹を表す値とし、その AUC を溶媒対照群と CNP 投与群の間で Student t 検定で比較した（SAS ver. 6.12）。

その結果、インドメタシン単独では膝関節腫脹を抑制しなかった。このとき、CNP 6 ng/日群は有意に膝関節腫脹を抑制した。しかし、CNP とインドメタシンを併用した群では CNP 単独群に対しても有意に膝関節腫脹を抑制していた（図 11）。この結果から、CNP による膝関節腫脹抑制は、単独投与では関節炎治療の標準薬である NSAID に比して有意な効果を有することに加え、NSAID との併用投与では相乗的な効果を有することが判明した。

実施例 10

ラットアジュバント関節炎モデルに対する CNP の作用

6 週齢の LEW/Crj 系オスラット（日本チャールズ・リバー社製）の背部皮下に、以下の溶液を含むオスモティックポンプ（2004 型、Durect 社製）を移植した。

・溶媒：5% デキストロース（純正化学社製）、10% マンノース（ナカライテス

ク社製) および 5 mmol/L 塩酸 (和光純薬社製) を含有する蒸留水。

CNP-22 (Calbiochem Novabiochem 社製) 10 μ g/mL 溶液 (60 ng/日)。

移植翌日に、結核死菌粉末 (M. TUBERCULOSIS DES. H37 RA、DIFCO LABORATORIES 社製) を 3 mg/mL の濃度で流動パラフィン (純正化学社製) に懸濁し、50 μ L をラット尾根部に皮内接種した。接種後、四肢末端の状態を以下の基準に従って経日的にスコア評価し、四肢末端スコアを合計したスコアをその個体の関節炎スコアとした。

スコア 0 : 病変なし

スコア 1 : 1 つ以上の指関節に発赤・腫脹が認められる。または甲の部分が赤変しているが腫脹は認められない。

スコア 2 : 前肢または後肢の甲に軽度の腫脹が認められる。

スコア 3 : 前肢または後肢の甲に高度な腫脹が認められるが、全ての指にはそれが認められない。

スコア 4 : 前肢または後肢の甲および指に高度の腫脹が認められる。

その結果、CNP 投与群では関節炎スコアが溶媒対照群に対して低下する傾向が認められた (図 12A)。

体重の推移も経日的に測定した。その結果、溶媒対照群に対して、CNP 投与群は有意に体重の増加高かった (図 12B)。

これらの結果から、CNP はラットアジュバントモデルにおいても関節炎を抑制し、一般状態を改善することが判明した。

実施例 1 1

ラットコラーゲン関節炎モデルに対する CNP の作用

10 週齢の DA/Slc 系メスラット (日本エスエルシー社製) の背部皮下に、以下の溶液を含むオスモティックポンプ (2004 型、Durect 社製) を移植した。

- ・溶媒 : 5 % デキストロース (純正化学社製)、10% マンノース (ナカライテスク社製) および 5 mmol/L 塩酸 (和光純薬社製) を含有する蒸留水。

- ・CNP-22 (Calbiochem Novabiochem 社製) 1 mg/mL 溶液 (6 μ g/日)。

移植直後に、ウシ II 型コラーゲン (コラーゲン技術研修会社製) を 1.5 mg/mL に

なるよう 0.1 mol/L 酢酸水に溶解し、等用量の Adjuvant Incomplete Adjuvant (DIFCO LABORATORIES 社製)と懸濁した液 400 μ L をラット背部に皮内接種した。接種後、体重の推移も経日的に測定した。また、ポンプ移植も接種も行わない正常群も設定し、同様に体重の推移を測定した。

その結果、正常群に対して溶媒対照群は有意に体重が減少するのに対して、CNP 投与群は溶媒対照群に対して有意に体重減少が少なかった (図 13)。この結果から、CNP はラットコラーゲン関節炎モデルにおいて、一般状態を改善することが判明した。

産業上の利用可能性

本発明の、GC-B 活性化物質を有効成分として含む治療剤又は予防剤は、関節軟骨の厚さおよび関節軟骨細胞数が有意に増加させること、関節腫脹に抵抗性であること、関節軟骨変性が抑制されること、滑膜細胞増勢、肉芽組織形成、炎症性細胞浸潤の変化が著しく弱いこと、並びに、関節軟骨中のプロテオグリカン含量が低下しないことなどの効能をもつことから、変形性膝関節症、変形性股関節症、変形性肘関節症、変形性脊椎症、顎関節症などの変形性関節症を含む関節炎症の治療又は予防のために有用である。本発明の医薬の投与によって、関節患部における関節軟骨基質および軟骨細胞数の減少抑制又は再生が起こり、関節軟骨変性と関節部の腫脹が抑制され、これによって関節炎症が抑制又は軽減される。特に本発明の変形性関節症治療剤は、従来の関節鏡視下手術、人工関節置換や骨切り術などの整形外科手術と比べて患者の負担や苦痛が少ないために、患者の QOL に配慮した、優れた治療剤となりうる。

GC-B 活性化物質が上記のような効能をもつという新規の知見から、GC-B を活性化することによって、関節炎症を抑制すること及び関節軟骨細胞の増殖を促進させることが可能である。また、GC-B の活性(たとえば細胞内 c GMP 産生量)を指標とすることによって、関節軟骨細胞増殖促進剤や関節炎症治療剤をスクリーニングすることも可能である。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 の説明：6-Cys と 22-Cys の間でジスルフィド結合が形成される。

配列番号 2 の説明：37-Cys と 53-Cys の間でジスルフィド結合が形成される。

配列番号 3 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、6-Cys と 22-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 4 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、6-Cys と 22-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 5 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、6-Cys と 22-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 6 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、1-Cys と 17-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 7 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、7-Cys と 23-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 8 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、6-Cys と 22-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 9 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体(ここで、1-Cys と 17-Cys の間でジスルフィド結合が形成される)。

配列番号 10 の人工配列の説明：CNP-22 誘導体 (ここで、4-Xaa=Leu, Ile, Val; 5-Xaa=Lys, Leu, Met; 6-Xaa=Leu, Ile, Ala, Val; 11-Xaa=Ser, Ala, Gly, Thr, Asn; 12-Xaa=Met, Ala, Trp, His, Lys, Ser, Gly; 14-Xaa=Gly, Lys, Ala, Leu; 15-Xaa=Leu, Met。また、1-Cys と 17-Cys の間でジスルフィド結合が形成される。))。

請求の範囲

1. グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節炎症の治療剤又は予防剤。
2. 前記関節炎症が変形性関節症である、請求項 1 に記載の治療剤又は予防剤。
3. 前記変形性関節症が荷重関節の変形性関節症又は非荷重関節の変形性関節症である、請求項 2 に記載の治療剤又は予防剤。
4. 前記変形性関節症が変形性膝関節症である、請求項 3 に記載の治療剤又は予防剤。
5. 前記変形性関節症が変形性股関節症である、請求項 3 に記載の治療剤又は予防剤。
6. 前記変形性関節症が顎関節症である、請求項 3 に記載の治療剤又は予防剤。
7. 前記関節炎症が関節リウマチに起因する、請求項 1 に記載の治療剤又は予防剤。
8. 前記関節炎症が変形性関節症に起因する、請求項 1 に記載の治療剤又は予防剤。
9. 前記 GC-B 活性化物質が、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) 又はその誘導体である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の治療剤又は予防剤。
10. 前記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択される、請求項 9 に記載の治療剤又は予防剤。
11. 前記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、請求項 9 に記載の治療剤又は予防剤。
12. 前記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 ～ 数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、請求項 9 に記載の治療剤又は予防剤。
13. 少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬をさらに含む、請求項 1 に記載の治療剤又は予防剤。

14. GC-B 活性化物質を有効成分として含むことを特徴とする、関節軟骨細胞増殖促進剤。

15. 前記 GC-B 活性化物質が、CNP 又はその誘導体である、請求項 14 に記載の増殖促進剤。

16. 前記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である、請求項 15 に記載の増殖促進剤。

17. 前記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、請求項 15 に記載の増殖促進剤。

18. 前記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 ～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、請求項 15 に記載の増殖促進剤。

19. 少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬をさらに含む、請求項 14 に記載の増殖促進剤。

20. GC-B を活性化することによって関節炎症を抑制することを特徴とする、関節炎症の抑制方法。

21. 前記 GC-B が、CNP 又はその誘導体によって活性化される、請求項 20 に記載の抑制方法。

22. 前記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である、請求項 21 に記載の抑制方法。

23. 前記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、請求項 21 に記載の抑制方法。

24. 前記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 ～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、請求項 21 に記載の抑制方法。

25. 前記 GC-B が、CNP 又はその誘導体と少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬との組み合わせによって活性化される、請求項 20 に記載の抑制方法。

26. GC-B を活性化することによって関節軟骨細胞の増殖を促進することを特徴とする、関節軟骨細胞の増殖促進方法。

27. 前記 GC-B が、CNP 又はその誘導体によって活性化される、請求項 26

に記載の増殖促進方法。

28. 前記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 又は CNP-53 である、請求項 27 に記載の増殖促進方法。

29. 前記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、請求項 27 に記載の増殖促進方法。

30. 前記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 ～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、請求項 27 に記載の増殖促進方法。

31. 前記 GC-B が、CNP 又はその誘導体と少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬との組み合わせによって活性化される、請求項 26 に記載の増殖促進方法。

32. GC-B の活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、関節軟骨細胞増殖促進剤のスクリーニング方法。

33. GC-B を発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞の GC-B 活性を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、請求項 32 に記載のスクリーニング方法。

34. 前記 GC-B 活性が、細胞内 c GMP 産生量として測定される、請求項 32 又は請求項 33 に記載のスクリーニング方法。

35. GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として関節軟骨細胞の増殖促進について候補薬剤をスクリーニングすることを含む、請求項 32 に記載のスクリーニング方法。

36. GC-B の活性を指標として、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤のスクリーニング方法。

37. GC-B を発現する培養細胞又は関節軟骨細胞由来の細胞を準備し、該細胞を候補薬剤の存在下で培養し、該細胞の GC-B 活性を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含

む、請求項 36 に記載のスクリーニング方法。

38. 前記 GC-B 活性が、細胞内 c GMP 産生量として測定される、請求項 36 又は 37 に記載のスクリーニング方法。

39. GC-B を強制発現させた培養細胞株を準備し、該細胞株を候補薬剤の存在下又は非存在下で培養し、該細胞株の細胞内 c GMP の産生量を測定し、候補薬剤の存在下と非存在化での細胞内 c GMP 産生量の差を指標として変形性関節症、関節リウマチあるいは関節炎症治療剤の候補薬剤をスクリーニングすることを含む、請求項 36 に記載のスクリーニング方法。

40. グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質を有効成分として含む、変形性関節症の治療剤又は予防剤。

41. 少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬をさらに含む、請求項 40 に記載の変形性関節症の治療剤又は予防剤。

42. グアニルシクラーゼ B (GC-B) 活性化物質を有効成分として含む、関節リウマチの治療剤又は予防剤。

43. 少なくとも 1 つの非ステロイド性抗炎症薬をさらに含む、請求項 42 に記載の、関節リウマチの治療剤又は予防剤。

44. 非ステロイド性活性化剤を含む、GC-B 活性化物質に対する活性化促進剤。

45. 前記 GC-B 活性化物質が、CNP 又はその誘導体である、請求項 44 に記載の活性化促進剤。

46. 前記 CNP が、ヒトを含む哺乳類又は鳥類由来の CNP-22 及び CNP-53 から選択される、請求項 45 に記載の活性化促進剤。

47. 前記 CNP が、配列番号 1 の CNP-22 又は配列番号 2 の CNP-53 である、請求項 45 に記載の活性化促進剤。

48. 前記誘導体が、配列番号 1 又は配列番号 2 のアミノ酸配列において 1 ～数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加しかつ CNP 活性を有するものである、請求項 45 に記載の活性化促進剤。

49. 前記非ステロイド性活性化剤がシクロオキシゲナーゼ酵素抑制剤である、請求項 44 に記載の活性化促進剤。

50. 前記シクロオキシゲナーゼ酵素抑制剤がインドメタシン、イブプロフェン、ピロキシカム、サリチル酸、ジクロフェナク、ケトプロフェン、ナプロキセン及びピロキシカムからなる群より選択される、請求項 49 に記載の活性化促進剤。

51. 請求項 44～50 のいずれかに記載の活性化促進剤を使用することを特徴とする、GC-B 活性化物質の活性化方法。

図 1 A

図 1 B

図 1 C

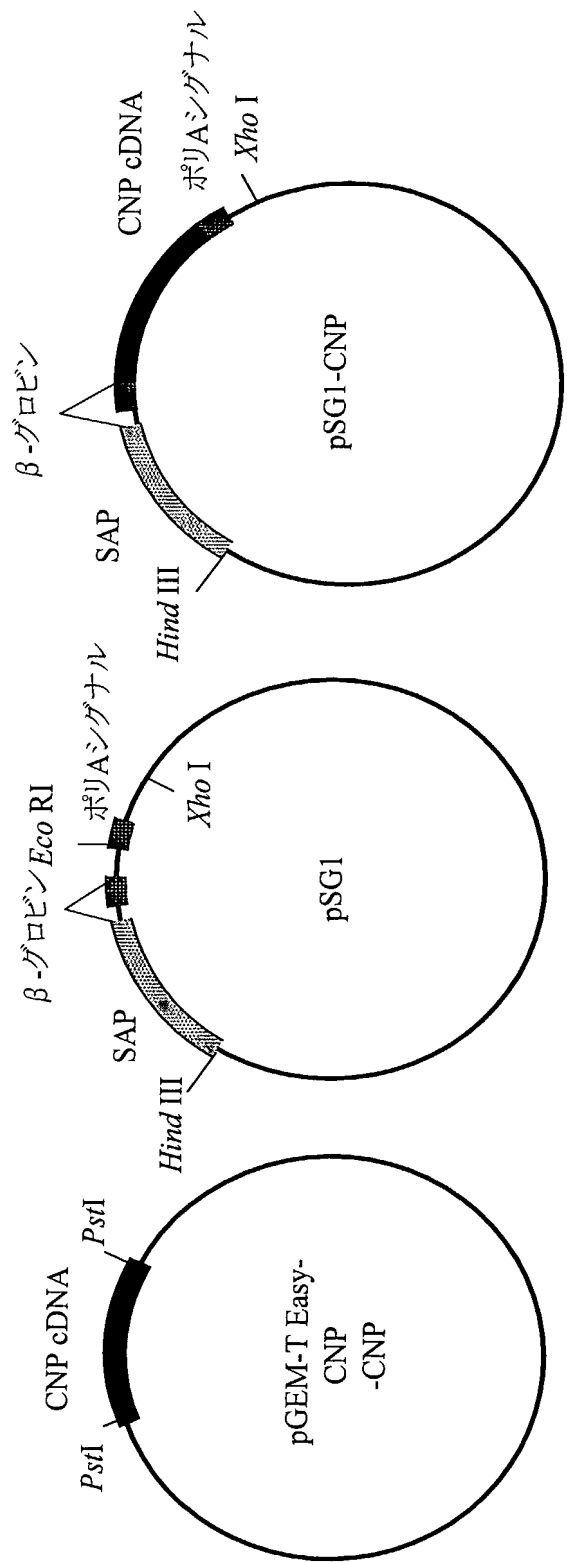


図 2

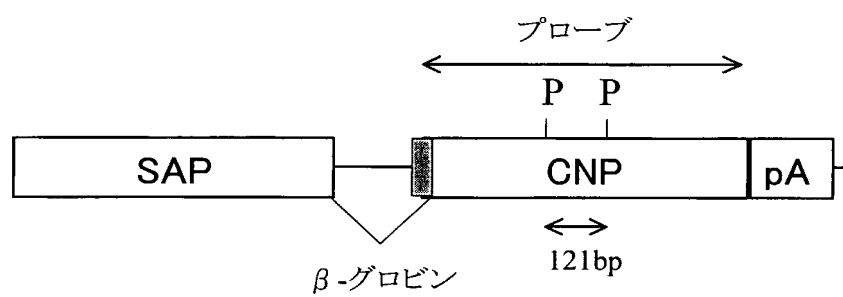


図 3

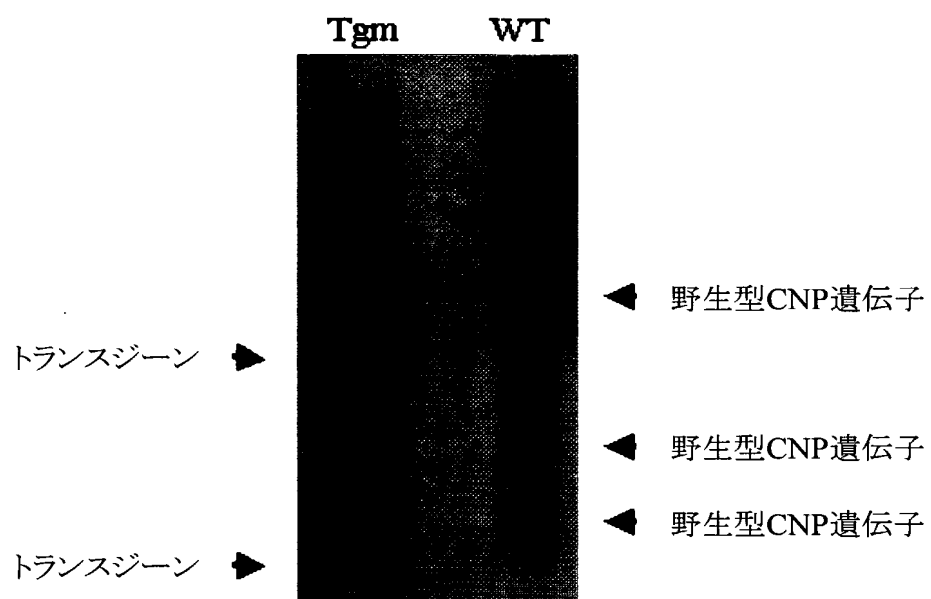


図 4

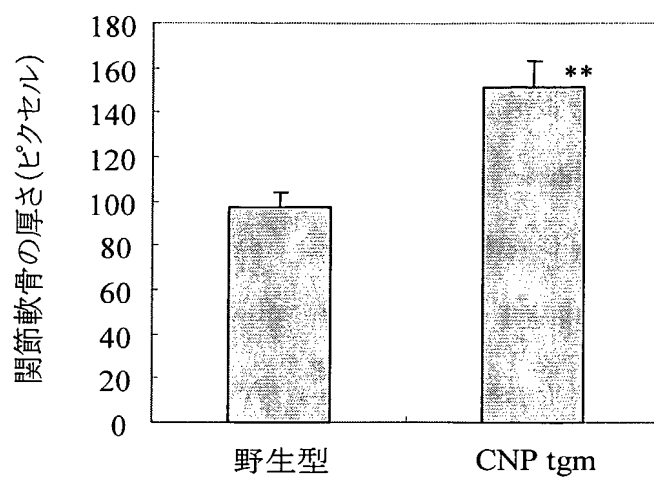


図 5

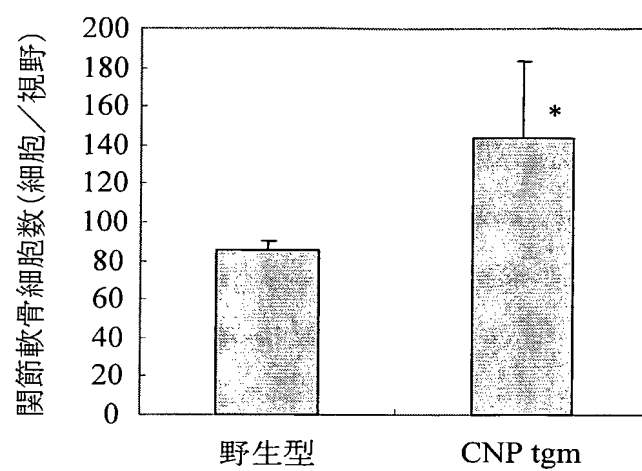


図 6 A

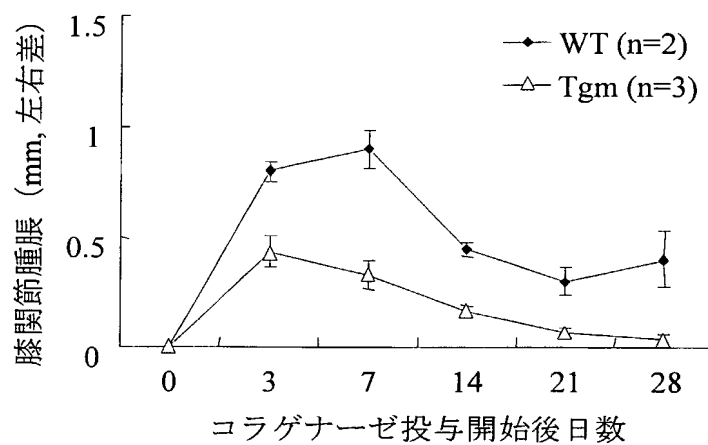


図 6 B

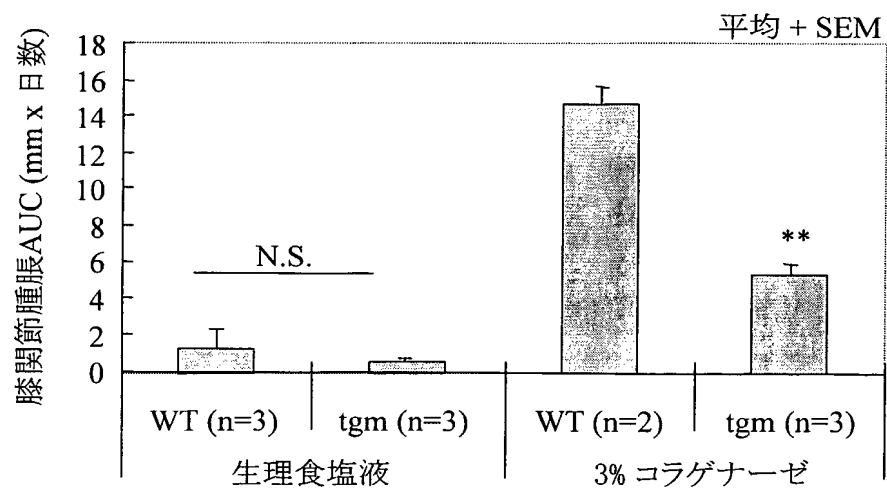


図 7 A

正常滑膜組織

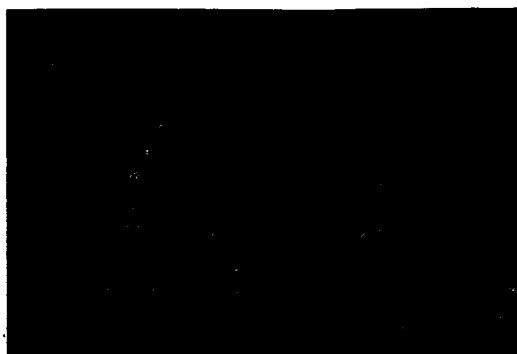


図 7 B

3% コラゲナーゼ投与、野生型



図 7 C

3% コラゲナーゼ投与、
CNP トランスジェニックマウスtgml系 #17



図 8 A

正常関節軟骨

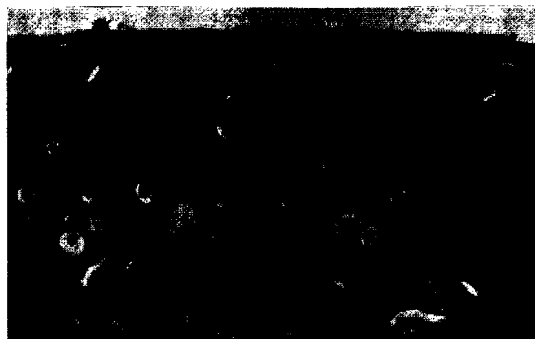


図 8 B

3% コラゲナーゼ投与、野生型

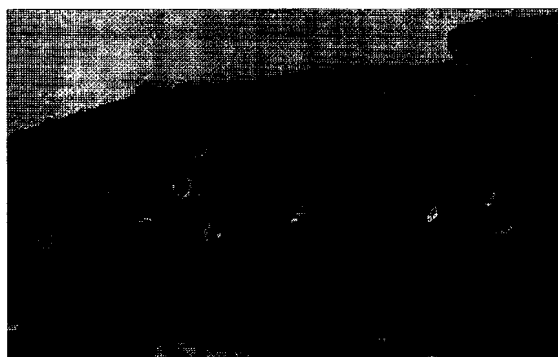


図 8 C

3% コラゲナーゼ投与、
CNPTランスジェニックマウス tgm系 #17

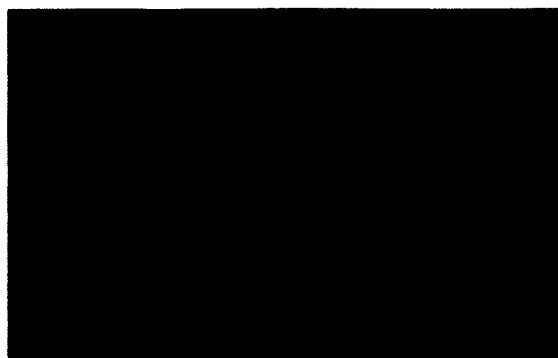


図 9

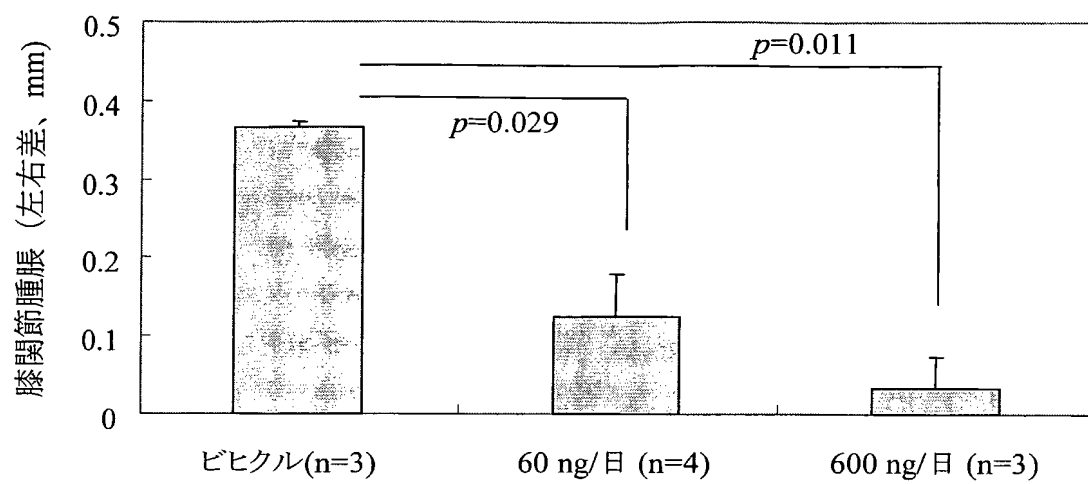


図 10

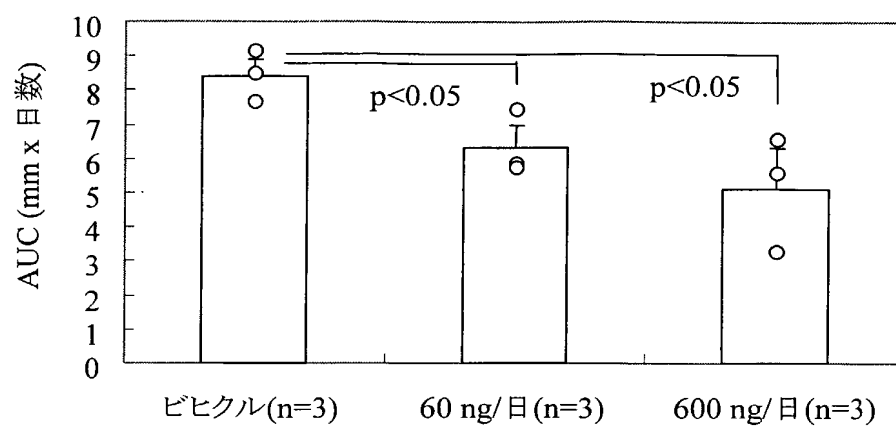


図 1 1 A

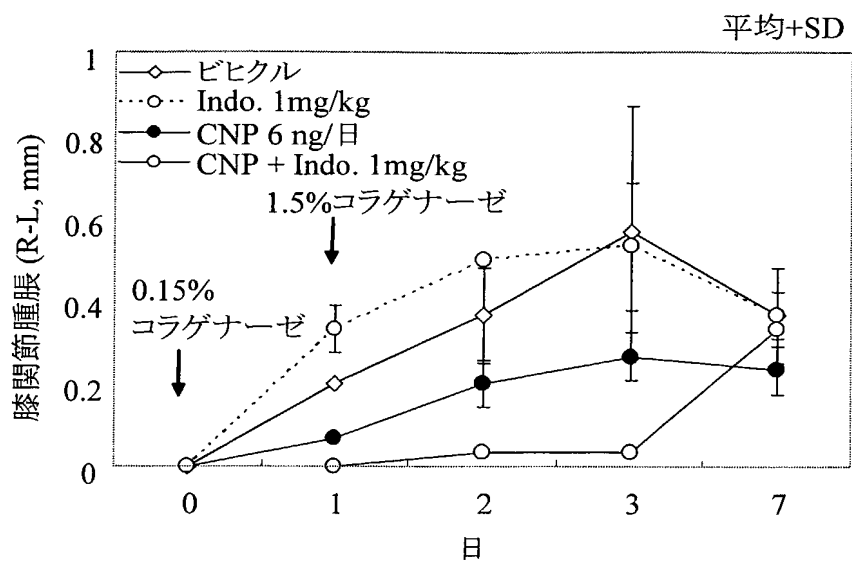


図 1 1 B

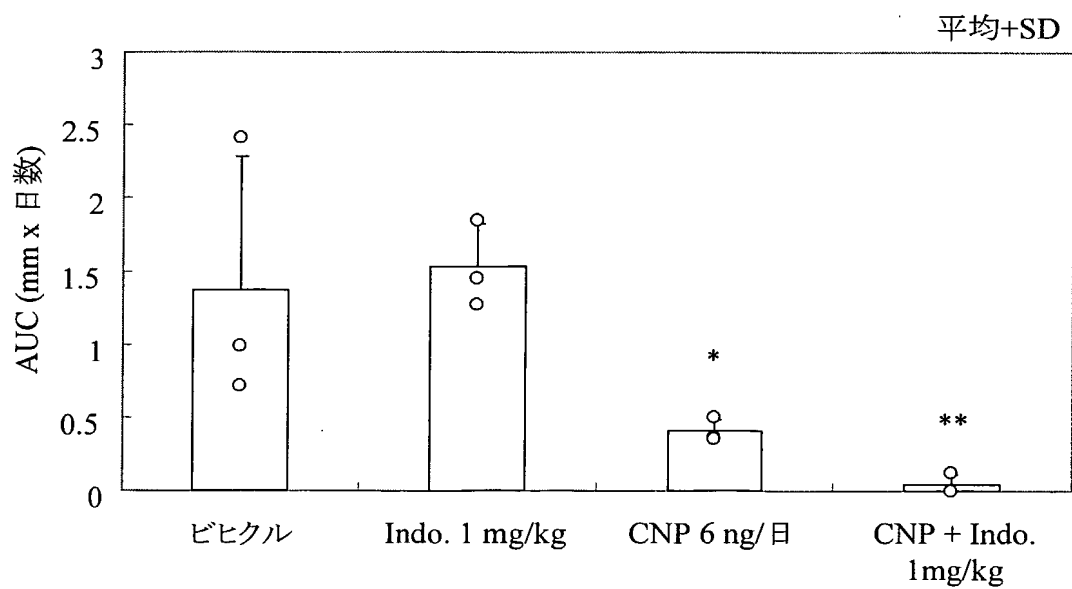


図 1 2 A

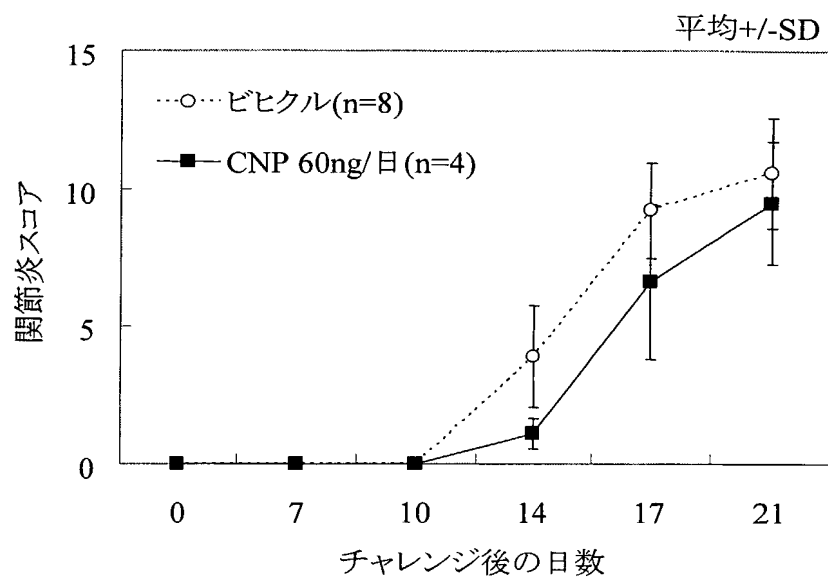


図 1 2 B

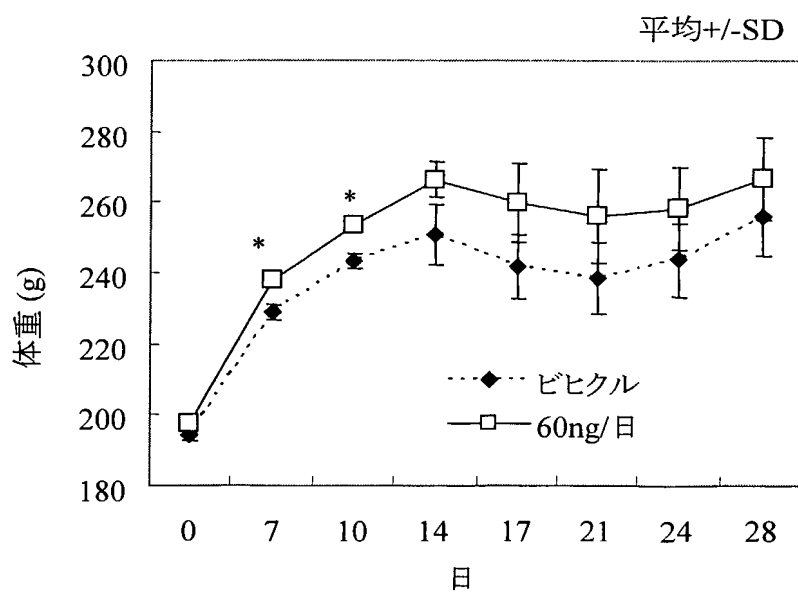
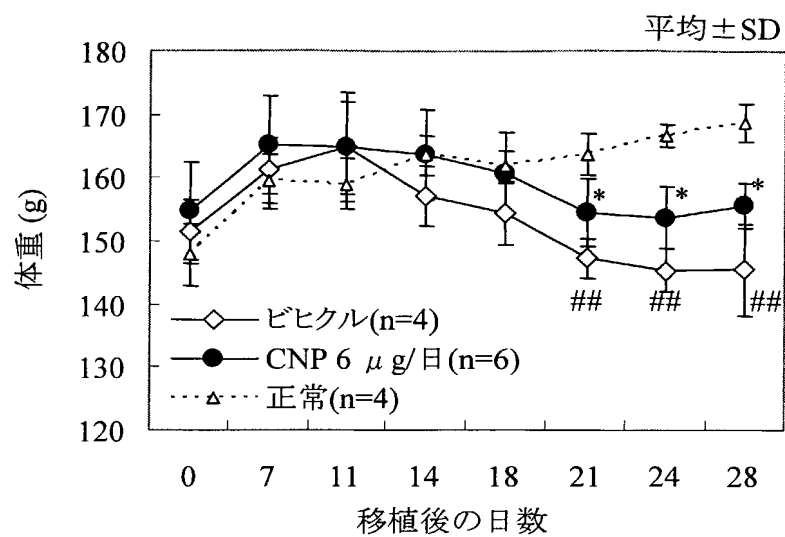


図 1 3



SEQUENCE LISTING

<110> Nakao, Kazuwa

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Agent for treating or preventing arthritis

<130> PH-2442-PCT

<150> JP 2004-107924

<151> 2004-03-31

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Description: A disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 1

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1

5

10

15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 2

<211> 53

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Description: A disulfide bond is formed between 37-Cys and 53-Cys

<400> 2

Asp Leu Arg Val Asp Thr Lys Ser Arg Ala Ala Trp Ala Arg Leu Leu

1

5

10

15

Gln Glu His Pro Asn Ala Arg Lys Tyr Lys Gly Ala Asn Lys Lys Gly

20

25

30

Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met

35

40

45

Ser Gly Leu Gly Cys

50

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 3

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ala

1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 4

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1 5 10 15

Gln Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 5

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser

1

5

10

15

Ala Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 1-Cys and 17-Cys

<400> 6

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Met Ser Gly Leu Gly

1

5

10

15

Cys

<210> 7

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 7-Cys and 23-Cys

<400> 7

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly

1

5

10

15

Ser Met Ser Gly Leu Gly Cys

20

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 6-Cys and 22-Cys

<400> 8

Gly Leu Ser Lys Gly Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser
1 5 10 15

Met Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
20 25

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where a disulfide bond is formed between 1-Cys and 17-Cys

<400> 9

Cys Phe Gly Leu Lys Leu Asp Arg Ile Gly Ser Gln Ser Gly Leu Gly
1 5 10 15

Cys Asn Ser Phe Arg Tyr
20

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:CNP-22

derivative, where 4-Xaa=Leu, Ile, Val; 5-Xaa=Lys, Leu, Met; 6-Xaa=Leu, Ile, Ala, Val; 11-Xaa=Ser, Ala, Gly, Thr, Asn; 12-Xaa=Met, Ala, Trp, His, Lys, Ser, Gly; 14-Xaa=Gly, Lys, Ala, Leu; 15-Xaa=Leu, Met and where a disulfide bond is formed between 1-Cys and 17-Cys

<400> 10

Cys Phe Gly Xaa Xaa Xaa Asp Arg Ile Gly Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Gly

1

5

10

15

Cys

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006831

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/00, 45/06, A61P17/00, 17/06, 19/02, 19/06, 19/10,
29/00, 31/04, 31/06, 31/10, 31/12, 37/02, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K38/00-45/08, A61P1/00-43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), CAPLUS (STN),
WPI (DIALOG), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-113116 A (Hitokazu NAKAO), 18 April, 2003 (18.04.03), Full text & US 2003/0068313 A1 & CA 2398030 A1 & JP 2003-104908 A & BR 200203181 A & US 6743425 B2	1-19, 32-50
Y	Yasato KOMATSU et al., "Nankotsu Eiyosho Chiryo to CNP", Clinical Calcium, 2003, 13(12), pages 1578 to 1581, full text	1-19, 32-50
Y	YASODA, A. et al., Natriuretic Peptide Regulation of Endochondral Ossification, J.Biol. Chem., 1998, 273(19), pages 11695 to 11700, full text	1-19, 32-50



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 June, 2005 (15.06.05)

Date of mailing of the international search report

05 July, 2005 (05.07.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006831

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-356437 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 13 December, 2002 (13.12.02), Claims; examples & WO 02/11752 A1 & AU 200176722 A	1-19, 32-50
Y	JP 59-51221 A (Eisai Co., Ltd.), 24 March, 1984 (24.03.84), Full text & EP 106177 A & US 4446129 A	4, 5, 9-12
Y	WO 02/087620 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 07 November, 2002 (07.11.02), Claims; examples & EP 1391211 A1 & AU 200221549 A1 & US 2004/0138285 A1	7, 9-12, 42, 43
Y	JP 4-74198 A (Toshiyuki MATSUO), 09 March, 1992 (09.03.92), Claims; Fig. 5 & EP 466174 A1 & US 5340920 A	10-12, 16-18, 46-48
Y	JP 4-327598 A (Shionogi & Co., Ltd.), 17 November, 1992 (17.11.92), Claims; Par. Nos. [0017], [0018]; Sequence listing (Family: none)	10-12, 16-18, 46-48
Y	JP 11-196873 A (Smithkline Beecham PLC), 27 July, 1999 (27.07.99), Claims & EP 922762 A1 & CA 2223075 A1	32-39
P, X P, Y	Yasato KOMATSU, "Nankotsu Saibo ni Okeru C-Gata Natriumu Rinyo Peptide Fukakka ni yoru Sayo Kiko ni Kansuru Kenkyu, C-Gata Natrium Rinyo Peptide Fukakka ni yoru Nankotsu Kesson Shufuku no tameno Atarashii Chiryoho no Kaihatsu to sono Rinsho Oyo ni kansuru Kenkyu", Heisei 15 Nendo Sokatsu- Buntan Kenkyu Hokokusho (Kosei Rodo Kagaku Kenkyuhi Hojokin Human Genome Saisei Iryo Nado Kenkyu Jigyo), 2004, March, pages 10 to 13	1-19, 40-50 32-39
P, A	Hiroshi KAWAGUCHI, "Saisei Sokushin Inshi", Japanese Journal of Clinical Medicine, 2005, 63(Zokango 1), pages 676 to 679	1-19, 32-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006831

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 20-31, 51
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in these claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
(Article 17(2)(a)(i) of the PCT, Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT)
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Claims 1 to 8, 13, 14, 19, 32 to 44, 49 and 50o Claims 1 to 8, 13, 14, 19, 40 to 44, 49 and 50

Each of the inventions according to these claims relates to a drug and the active ingredient thereof is restricted exclusively by its function, i.e., a GC-B activator, a nonsteroidal antiinflammatory agent or a cyclooxygenase inhibitor.

However, it is not self-evident based on the description even by a person skilled in the art substances of what chemical structures have these functions. Namely, it is unclear by merely specifying the functions what compounds are available as the active ingredient.

According to the statement in the description of the present case, specific results of having these functions were confirmed exclusively in the cases of using CNP as a GC-B activator and indometacin as a nonsteroidal antiinflammatory agent or a cyclooxygenase inhibitor and nothing is stated in the cases of using other components. Therefore, it cannot be considered that the same effects as those reported in the description can be established in such cases.

Such being the case, the inventions according to these claims are unclear from the statements in these claims and it does not appear that the description discloses the inventions in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art. Thus, the inventions according to these claims are not sufficiently supported by the description (PCT Articles 5 and 6).

o Claims 32 to 39

Each of the inventions according to these claims relates to a drug screening method.

Generally speaking, an activity level usable as a standard for specific judgment should be clearly indicated in an invention relating to a screening method. Examining the disclosure in the description of the present case, however, no specific indication in the screening method is given. Examining the statements in EXAMPLES, moreover, it cannot be recognized that a screening was performed in practice.

Such being the case, it does not appear that the description discloses the inventions according to these claims in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art. Thus, the inventions according to these claims are not sufficiently supported by the description (PCT Articles 5 and 6).

Since the inventions according to these claims are not supported by the disclosure in the description, it is to be noted that, in marking this international search report, prior art documents were searched exclusively based on the cases wherein CNP and its derivatives as claimed in claims 9 to 12 and the specific cyclooxygenase inhibitor as claimed in claim 50 were employed as the active ingredient (claims 1 to 8, 13, 14, 19, 40 to 44, 49 and 50) and within a reasonable scope from the disclosure in the description.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/00, 45/06, A61P17/00, 17/06, 19/02, 19/06, 19/10, 29/00, 31/04, 31/06, 31/10, 31/12, 37/02, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K38/00-45/08, A61P1/00-43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), C Aplus (STN), WPI (DIALOG), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2003-113116 A (中尾 一和) 2003.04.18, 全文参照, & US 2003/0068313 A1 & CA 2398030 A1 & JP 2003-104908 A & BR 200203181 A & US 6743425 B2	1-19, 32-50
Y	小松 弥郷ら, 軟骨栄養症治療と CNP, Clinical Calcium, 2003, 13(12), pp.1578-1581, 全文参照	1-19, 32-50

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.06.2005

国際調査報告の発送日

05.7.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

荒木 英 則

4 C

9 7 3 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YASODA, A., <i>et al.</i> , Natriuretic Peptide Regulation of Endochondral Ossification. J. Biol. Chem., 1998, 273(19), pp. 11695-11700, 全文参照	1-19, 32-50
Y	JP 2002-356437 A (武田薬品工業株式会社) 2002. 12. 13, 請求の範囲, 実施例, & WO 02/11752 A1 & AU 200176722 A	1-19, 32-50
Y	JP 59-51221 A (エーザイ株式会社) 1984. 03. 24, 全文参照, & EP 106177 A & US 4446129 A	4, 5, 9-12
Y	WO 02/087620 A1 (中外製薬株式会社) 2002. 11. 07, 請求の範囲, 実施例, & EP 1391211 A1 & AU 200221549 A1 & US 2004/0138285 A1	7, 9-12, 42, 43
Y	JP 4-74198 A (松尾 壽之) 1992. 03. 09, 請求の範囲, 第 5 図, & EP 466174 A1 & US 5340920 A	10-12, 16-18, 46-48
Y	JP 4-327598 A (塩野義製薬株式会社) 1992. 11. 17, 請求の範囲, 【0017】、【0018】、配列表 (ファミリーなし)	10-12, 16-18, 46-48
Y	JP 11-196873 A (スミスクライン・ビーチャム・コーポレーション) 1999. 07. 27, 請求の範囲, & EP 922762 A1 & CA 2223075 A1	32-39
PX	小松 弥郷, 軟骨細胞における C 型ナトリウム利尿ペプチド賦活化による作用機構に関する研究, C 型ナトリウム利尿ペプチド賦活化による軟骨欠損修復のための新しい治療法の開発とその臨床応用に関する研究 平成 15 年度 総括・分担研究報告書 (厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業), 2004 年 3 月, pp. 10-13	1-19, 40-50
PY		32-39
PA	川口 浩, 再生促進因子, 日本臨牀, 2005, 63 (増刊号 1), pp. 676-679	1-19, 32-50

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20-31, 51 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、これらの請求の範囲に係る発明は、治療による人体の処置方法に関するものである。（PCT17条(2)(a)(i)、PCT規則39.1(iv)）
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲1-8, 13, 14, 19, 32-44, 49, 50について**○請求の範囲1-8, 13, 14, 19, 40-44, 49, 50について**

これらの請求の範囲に係る発明はいずれも薬剤に関するものであって、その有効成分はGC-B 活性化物質、並びに、非ステロイド性抗炎症薬またはシクロオキシゲナーゼ酵素抑制剤、すなわち、その機能のみで限定されたものである。

しかしながら、このような記載によっては、いかなる化学構造を有するものであれば当該機能を有するものであるのかは当業者といえども自明なものであるということとはできないから、単に当該機能が特定されるのみではいかなる化合物が有効成分となるのかが不明確である。

また、本願明細書の記載によれば、当該機能を有するものとして具体的にその結果が確認されているのは、GC-B 活性化物質として CNP を、非ステロイド性抗炎症薬またはシクロオキシゲナーゼ酵素抑制剤としてインドメタシンを用いた場合のみであって、他の成分を用いた場合については何ら記載されていないため、このような場合についてまで明細書に記載されたものと同様の作用を示すことが示されたものとは認められない。

したがって、これらの請求の範囲の記載によってはこれらの請求の範囲に係る発明が不明確であり、また、このような明細書の記載によっては、当業者がこれらの請求の範囲に係る発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されたものとはいえず、これらの請求の範囲に係る発明について十分な裏付けとなるよう記載されたものということとはできない(PCT 5条および6条)。

○請求の範囲32-39について

これらの請求の範囲に係る発明は、いずれも薬剤のスクリーニング方法に関するものである。

ところで、一般にスクリーニング方法に関する発明においては、指標として、具体的に判断の基準となる活性の程度が明示される必要がある。しかしながら、本願明細書の記載をみても、当該スクリーニング方法について何らそのような具体的指標が示されておらず、実施例の記載をみても、実際にスクリーニングが行われたものとも認められない。

したがって、このような明細書の記載によっては、当業者がこれらの請求の範囲に係る発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されたものとはいえず、これらの請求の範囲に係る発明について十分な裏付けとなるよう記載されたものということとはできない(PCT 5条および6条)。

そして、本願明細書の記載はこれらの請求の範囲に係る発明に関する裏付けを欠くものとなっているから、国際調査報告の作成に際しては、有効成分が請求の範囲9から12に記載のCNP およびその誘導体、並びに、請求の範囲50に記載の具体的なシクロオキシゲナーゼ酵素抑制剤である場合(請求の範囲1-8, 13, 14, 19, 40-44, 49, 50)、および、明細書の記載からみて合理的な範囲のみを先行技術調査の対象とした点に留意されたい。